

# **Vergleichende Analyse saisonaler, aviärer, porziner und pandemischer Influenzaviren in humanen Lungen- und Zellkulturen**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin  
von

Diplom-Humanbiologin Viola K. Weinheimer

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter/in:    1. Prof. Dr. Richard Lucius  
                      2. PD Dr. Thorsten Wolff  
                      3. Prof. Dr. Andreas Herrmann

Datum der Einreichung:    August 2011

Datum der Promotion:      9. Dez. 2011

*Für meine Eltern*

## Zusammenfassung

Das Auftreten des pandemischen H1N1-Influenzavirus 2009 und die kontinuierliche Übertragung hochpathogener H5N1-Viren (HPAIV) auf den Menschen verdeutlichen die Wichtigkeit zoonotischer Übertragungen. Bis heute sind die Restriktion tierpathogener Influenzaviren und die hohe Virulenz der HPAIV im Menschen nicht vollständig geklärt.

Verschiedene Modelle wurden zur Studie von Influenzaviren verwendet, u. a. Zelllinien, die jedoch die Komplexität und Zelltypen der humanen Lunge nur unzureichend wiedergeben. Daher wurde ein humanes *ex vivo* Lungenkulturmodell etabliert in welchem die komplexe Struktur und die verschiedenen Zelltypen der humanen Lunge erhalten bleiben. Mit Hilfe dieses Modells und primären und permanenten humanen Zellen wurden saisonale, pandemische, porzine, HPAIV und niedrigpathogene aviäre Influenzaviren (LPAIV) systematisch hinsichtlich Replikation, Cytokininduktion und Zelltropismus verglichen. HPAIV replizierten wie auch saisonale und pandemische Viren zu hohen Titern, während sich LPAIV und ein porzines Virus kaum vermehrten. Einhergehend mit dem Vorhandensein aviärer Rezeptoren waren LPAIV dennoch fähig Lungenkulturen und Zellen zu infizieren und es fanden sich keine Unterschiede im Vorhandensein und in der Lokalisation viraler Proteine. Die Infektion mit HPAIV und LPAIV führten im Lungenmodell zu einer erhöhten Induktion von IP-10, MIP-1 $\beta$ , IFN- $\beta$  und IL-1 $\beta$ , während saisonale und pandemische H1N1-Viren nur geringe Cytokinspiegel hervorriefen. Trotz der hier beobachteten Unterschiede in der Replikation und Cytokininduktion infizierten alle Viren überwiegend Typ II Pneumozyten. Dies impliziert, dass sich die gezeigten Unterschiede zwischen saisonalen und aviären Viren nicht durch Unterschiede im Zelltropismus erklären lassen.

Die im Rahmen dieser Studie erzielten Ergebnisse korrelieren gut mit klinischen Beobachtungen. Dies verdeutlicht den Wert humaner *ex vivo* Kulturen um weitere Einblicke in das pathophysiologische Verhalten von Pathogenen zu bekommen.

Schlagwörter: Influenzaviren, H5N1-Viren, humane Lungenkulturen, Cytokine, Speziesbarriere

## Abstract

The emergence of the pandemic H1N1 influenza A virus in 2009 and the continuous threat by highly pathogenic avian H5N1 human infections underlines the importance of zoonotic transmissions. The inability of most animal influenza viruses to replicate efficiently in the human respiratory tract and the high virulence of highly pathogenic avian H5N1 viruses (HPAIV) are still not fully understood.

Several models have been used to study influenza virus infections including human cell lines that lack the complexity and cell diversity of the human lung. Therefore, a human lung explant model in which the three-dimensional structure of the human lung is preserved along with the different cell-cell interactions was established. Using this model and commonly used primary and permanent respiratory cells, replication, cytokine induction and cell tropism of human, avian, swine and pandemic 2009 virus was systematically compared. It was shown that HPAIV as well as seasonal and pandemic 2009 viruses replicated to high titers while a low pathogenic avian (LPAIV) or a classical swine virus only replicated inefficiently. However, along with the presence of avian receptors, LPAIV was able to infect human lung explants and cells and there were no differences in abundance and localization of proteins. Infection of human lung explants with the HPAIV and LPAIV lead to a pronounced induction of IP-10, MIP-1 $\beta$ , IFN- $\beta$  and IL-1 $\beta$  while seasonal and pandemic 2009 viruses caused only a low cytokine response. Despite their differences in replication and cytokine induction, LPAIV and the seasonal virus both primarily targeted type II pneumocytes suggesting that the observed differences between the two viruses are not due to differences in cell tropism in the human lower respiratory tract.

The experimental findings obtained in this study are compatible with clinical observations highlighting the value of *ex vivo* human lung explants to provide insights into viral pathophysiological behavior in humans.

Key words: influenza virus, H5N1 virus, human lung cultures, cytokines, species barrier

## ***Inhaltsverzeichnis***

<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>i</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>ii</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>vii</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>- 1 -</b>
1.1 Influenza-A-Viren .....	- 1 -
1.1.1 Aufbau des Viruspartikels und Genomorganisation.....	- 2 -
1.1.2 Infektionszyklus der Influenza-A-Viren.....	- 4 -
1.1.3 Pathogenese und Epidemiologie .....	- 8 -
1.1.4 Die Epidemiologie pandemischer H1N1-Viren 2009 .....	- 10 -
1.1.5 Die Epidemiologie hochpathogener H5N1-Viren .....	- 11 -
1.2 Speziesbarriere der Influenzaviren .....	- 12 -
1.3 Das nicht adaptive Immunsystem .....	- 15 -
1.3.1 Das Typ I Interferonsystem.....	- 16 -
1.3.2 Interaktion viraler Proteine mit dem Interferonsystem ....	- 19 -
1.4 Der humane Respirationstrakt .....	- 19 -
1.5 Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....	- 22 -
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>- 25 -</b>
2.1 Material .....	- 25 -
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	- 25 -
2.1.2 Verwendete Zellen .....	- 28 -
2.1.3 Humane Lungenkulturen.....	- 29 -
2.1.4 Verwendete Influenzavirusstämme.....	- 29 -
2.1.5 Antikörper .....	- 29 -
2.1.6 Kits .....	- 30 -
2.1.7 Zell- und Lungenkulturmedien .....	- 30 -
2.1.7.1 Medien für A549-, Detroit- und MDCK-Zellen .....	- 30 -
2.1.7.2 Medien für B2B-Zellen.....	- 31 -
2.1.7.3 Medien für Calu-3-Zellen .....	- 32 -
2.1.7.4 Medien für Vero-Zellen .....	- 32 -
2.1.7.5 Medien für NHBE-Zellen.....	- 32 -
2.1.7.6 Medien für humane Lungenkulturen .....	- 32 -

2.1.8 Puffer und Lösungen .....	- 33 -
2.1.9 Geräte .....	- 35 -
2.1.10 Software .....	- 35 -
2.2 Methoden .....	- 36 -
2.2.1 Zell- und Lungenkultur .....	- 36 -
2.2.1.1 Kultur permanenter Zelllinien .....	- 36 -
2.2.1.2 Kultur primärer NHBE-Zellen .....	- 36 -
2.2.1.3 Präparation und Kultur des Lungengewebes.....	- 37 -
2.2.2 Arbeiten mit Influenzaviren .....	- 37 -
2.2.2.1 Infektion humaner Zellen und Lungenkulturen .....	- 37 -
2.2.2.2 Virusanzucht im Hühnerei, auf Vero- und MDCK- Zellen .....	- 38 -
2.2.2.3 Virustiterbestimmung mittels Plaquetest .....	- 39 -
2.2.2.3.1 Plaquetest mittels Avicelmedium .....	- 39 -
2.2.2.3.2 Plaquetest mittels Oxoidagar.....	- 39 -
2.2.2.4 Hämagglutinationstest (HA-Test) .....	- 40 -
2.2.2.5 Plaquereinigen der Virusstämme .....	- 41 -
2.2.3 Zellbiologische Methoden .....	- 41 -
2.2.3.1 FACS („ <i>Fluorescence activated cell sorting</i> “-Analyse .	- 41 -
2.2.3.2 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse .....	- 42 -
2.2.3.3 Elektronenmikroskopie .....	- 43 -
2.2.4 Proteinbiochemische Methoden .....	- 44 -
2.2.4.1 Herstellung von Zelllysaten .....	- 44 -
2.2.4.2 Herstellung von Lysaten aus Lungenkulturen .....	- 44 -
2.2.4.3 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	- 44 -
2.2.4.4 Fixieren und Trocknen von SDS-Gelen .....	- 45 -
2.2.4.5 Westernblotanalyse .....	- 45 -
2.2.4.6 „ <i>Pulse labeling</i> “ Experimente .....	- 46 -
2.2.4.7 „ <i>Pulse chase</i> “ Experimente.....	- 46 -
2.2.4.8 ELISA („ <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> “) .....	- 47 -
2.2.4.9 Multiplex-Cytokinassay .....	- 47 -
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>- 49 -</b>
3.1 Etablierung eines humanen Lungenkulturmodells .....	- 50 -
3.2 Expression aviärer und humaner Influenzavirusrezeptoren auf humanen Zellen .....	- 54 -

3.3 Replikation aviärer, porziner und saisonaler Influenzaviren in humanen Zell- und Lungenkulturen .....	- 56 -
3.3.1 Replikation in Zellkulturen des oberen und unteren Respirationstraktes .....	- 57 -
3.3.2 Replikation in primären Zellen und Lungenkulturen.....	- 59 -
3.4 Expression und Lokalisation viraler Proteine in A549-Zellen .....	- 61 -
3.5 Nachweis von Viruspartikeln im Überstand von A549-Zellen und Lungenkulturen nach Infektion mit Dk/Alb .....	- 64 -
3.6 Werden HA-Proteine in Virionen des niedrigpathogenen aviären Virus in humanen Lungenkulturen gespalten? .....	- 67 -
3.7 Replikation der pandemischen H1N1-Viren 2009 .....	- 69 -
3.8 Cytokininduktion aviärer, porziner und humanpathogener Influenzaviren.....	- 71 -
3.8.1 Induktion von Chemokinen, Interleukinen und Typ II Interferonen durch die verschiedenen Virusstämme.....	- 71 -
3.8.2 Induktion von Typ I Interferonen durch die verschiedenen Virusstämme.....	- 74 -
3.8.3 Nachweis der interferoninduzierten Proteine ISG15 und MxA.....	- 76 -
3.9 Zelltropismus aviärer und humanpathogener Influenzaviren in humanen Lungenkulturen .....	- 80 -
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>- 85 -</b>
4.1 Etablierung eines humanen Lungenkulturmodells .....	- 86 -
4.2 Aviäre, porzine und humanpathogene Influenza-A-Viren zeigen deutliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Vermehrung in humanen Zell- und Lungenkulturen.....	- 88 -
4.3 Ursachen der Restriktion niedrigpathogener aviärer Influenzaviren in der humanen Lunge.....	- 90 -
4.3.1 Proteine des niedrigpathogenen aviären Virus werden synthetisiert.....	- 90 -
4.3.2 Gebildete Virionen des niedrigpathogenen aviären Virus sind zum größten Teil nicht infektiös.....	- 91 -
4.4 Aktivierung der angeborenen Immunantwort durch aviäre, porzine und humanpathogene Influenzaviren.....	- 93 -
4.4.1 Cytokininduktion aviärer, porziner und humanpathogener Influenzaviren .....	- 93 -
4.4.2 Induktion des interferonstimulierten Gens ISG15 .....	- 96 -

4.5 Aviäre und humanpathogene Influenzaviren infizieren in der humanen Lunge vorwiegend Typ II Pneumozyten.....	- 97 -
4.6 Ineffektive Replikation des niedrigpathogenen aviären Virus und effektive Replikation des saisonalen und hochpathogenen Virus - ein Modell .....	- 99 -
<b>Literatur.....</b>	<b>- 101 -</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>I</b>
<i>Anhang I .....</i>	<i>I</i>
<i>Anhang II.....</i>	<i>II</i>
<i>Anhang III.....</i>	<i>III</i>
<i>Anhang IV.....</i>	<i>VIII</i>



# Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
5'-m7G	7-Methylguanidin-Kappe am 5'-Ende der mRNA
5'-PPP-RNA	5'-triphosphorylierte RNA
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BA	bovines Albumin
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
ca.	circa
C-terminal	carboxyterminal
cDNA	(„copy/complementary“) DNA
Ci	Curie
cLSM	Konfokales Laserscanmikroskop
CPSF30	<i>Cleavage and polyadenylation specificity factor 30</i>
cRNA	(„copy/complementary“) RNA
d	Tag(e)
Da	Dalton
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
d. h.	das heißt
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle's Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	2'-Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig ( <i>double stranded</i> )
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF2 $\alpha$	eukaryotischer Initiationsfaktor-2 $\alpha$
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	und andere ( <i>et alteri</i> )
FACS	Durchflusszytometrie ( <i>“fluorescence activated cell sorting“</i> )
FBS	fötales Rinderserum
G	Guanosin
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HAP	hämagglutinierende Partikel
HAT	„type II membrane protein human airway trypsin-like protease“
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>“horseradish peroxidase“</i> )
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IP-10	„IFN $\gamma$ -inducible protein“, CXCL10
IPS-1	Interferon- $\beta$ -Promotor Stimulator 1
IRF-3	Interferon regulierender Faktor 3
ISG	Interferon stimulierte(s) Gen(e)
ISGF-3	Interferon stimulierter Genfaktor-3
ISRE	DNA-Motiv über das Gene nach IFN-Stimulation aktiviert

I	Liter
LK	Lamellarkörperchen
M	molar (mol/l)
M1 und 2	Matrixprotein 1 und 2
MDA-5	„ <i>Myeloma differentiation associated</i> “ Genprodukt 5
MDCK	Madin-Darby Hundenieren (-Zellen)
MEM	Minimal erforderliches Medium („ <i>minimal essential medium</i> “)
min	Minute
MIP-1 $\beta$	<i>Macrophage inflammatory protein 1-<math>\beta</math></i> , CCL4
Mock	Blindwert, Negativkontrolle
moi	Multiplizität der Infektion (Viren (pfu)/Zelle)
mRNA	„ <i>messenger</i> “ RNA
MxA	„ <i>Myxovirus (influenza virus) resistance A</i> “
N-terminal	
n	Anzahl Versuche
NA	Neuraminidase
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCR	nichtkodierende Region („ <i>non-coding region</i> “)
NES	Kernexportsignal („ <i>nuclear export signal</i> “)
NF- $\kappa$ B	Nukleärer Faktor- $\kappa$ B
NHBE	primäre humane bronchiolare Epithelzellen
NLR	NOD-ähnliche Rezeptoren
NP	Nukleoprotein
Nt	Nukleotid(e)
NS1 und 2	Nichtstrukturprotein 1 und 2
OAS	Oligoadenylatsynthetase
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
PA	saures („ <i>acidic</i> “) Polymeraseprotein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PB1 und 2	basische Polymeraseproteine 1 und 2
PB1-F2	Produkt des 2. Leserahmens („ <i>frame</i> “) im PB1-Segment
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pdm	pandemisch
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pfu	plaquebildende Einheiten
p. i.	nach der Infektion (lateinisch <i>post infectionem</i> )
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PKR	RNA-abhängige Proteinkinase R
PRR	Pathogen-, oder PAMP-erkennender Rezeptor
RANTES	„ <i>Regulated on activation normally T-cell expressed and secreted</i> “, CCL5
RIG-I	„ <i>Retinoic acid inducible gene product</i> “ I
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoproteinkomplex
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	„ <i>Roswell Park Memorial Institute</i> “
RT	Raumtemperatur
SA	Sialinsäure
SA $\alpha$ -2,3Gal	$\alpha$ -2,3 verlinkte Sialylsäurereste

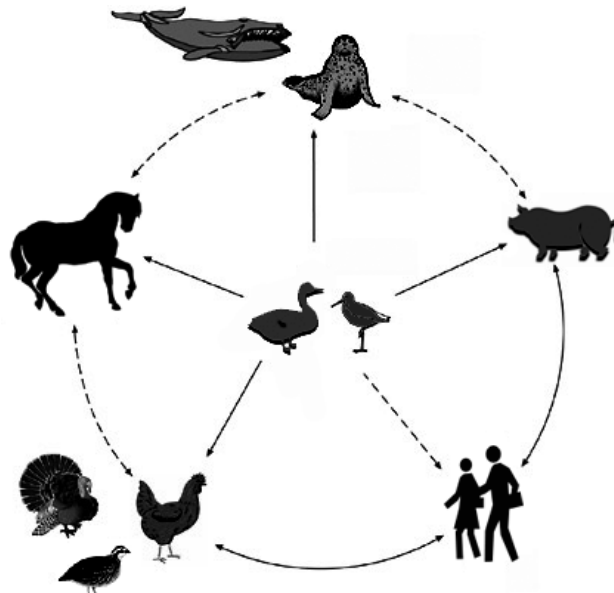
SA $\alpha$ -2,6Gal	$\alpha$ -2,6 verlinkte Sialylsäurereste
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardabweichung der Mittelwerte
siRNA	„small interfering“ RNA
SOCS	„Suppressor of cytokine signalling“
ss	einzelsträngig („single stranded“)
STAT	„Signal transducer and activator of transcription“
Tab.	Tabelle
TBE	Tris/Borsäure/EDTA-Puffer
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin
TLR	Toll-ähnliche Rezeptoren
TMPRSS	„transmembrane protease serine“
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TPCK	Tosyl-L-phenylalaninchlormethylketon
TRIM25	Ring-, Zink-Finger- und „coiled-coil“ (tripartite)-Motiv enthaltendes Protein 25
Tris	Tris(hydroxymethyl)ami
Triton-X100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
U	Uridin
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett
vRNA	virale RNA
vRNP	viraler Ribonukleoproteinkomplex
WB	Westernblot
WHO	Weltgesundheitsorganisation
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

## Aminosäuren

<b>A</b>	Ala	Alanin	<b>C</b>	Cys	Cystein	<b>D</b>	Asp	Asparaginsäure
<b>E</b>	Glu	Glutaminsäure	<b>F</b>	Phe	Phenylalanin	<b>G</b>	Gly	Glyzin
<b>H</b>	His	Histidin	<b>I</b>	Ile	Isoleucin	<b>K</b>	Lys	Lysin
<b>L</b>	Leu	Leucin	<b>M</b>	Met	Methionin	<b>N</b>	Asn	Asparagin
<b>P</b>	Pro	Prolin	<b>Q</b>	Gln	Glutamin	<b>R</b>	Arg	Arginin
<b>S</b>	Ser	Serin	<b>T</b>	Thr	Threonin	<b>V</b>	Val	Valin
<b>W</b>	Trp	Tryptophan	<b>Y</b>	Tyr	Tyrosin			



Influenza-A-Viren werden zusammen mit Influenza-B-, Influenza-C-, Thogoto- und Isaviren der Familie der *Orthomyxoviridae* zugeordnet und besitzen ein segmentiertes einzelsträngiges RNA-Genom in negativer Orientierung. Während Influenza-B- und Influenza-C-Viren fast ausschließlich beim Menschen auftreten, zeigen Influenza-A-Viren ein breites Wirtsspektrum von verschiedenen Säugern bis hin zu Vögeln (Abb. 1.1). Letztere, vor allem Wasservögel, bilden das natürliche Reservoir der Influenza-A-Viren.

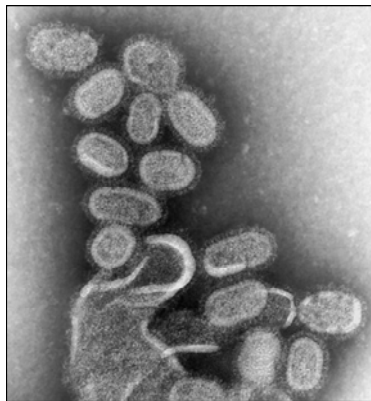


Influenza-A-Viren werden weiterhin entsprechend ihrer Oberflächenproteine Hämagglutinin (H1-H16) und Neuraminidase (N1-N9) in verschiedene Subtypen unterteilt. Die Benennung der Viren erfolgt gemäß WHO-Richtlinien durch Angabe des Typs, der Spezies aus der das Virus isoliert wurde, dem Ort der Isolation, einer laufenden Nummer, dem Jahr der Isolation und Nennung des Subtyps (z.B. A/swine/Wisconsin/1/67 (H1N1)). Bei humanen Isolaten wird auf das Nennen der Spezies verzichtet.

Influenzaviren zeichnen sich durch zwei Besonderheiten aus, die für neu auftretenden Virusvarianten verantwortlich sind: Antigen-*shift* und Antigen-*drift*. Das segmentierte Genom ermöglicht den Viren eine Reassortierung der Gen-segmente: wird dieselbe Zelle gleichzeitig von zwei verschiedenen Virussubtypen infiziert, kann es zur Vermischung der beiden Genome und zur Entstehung von Nachkommenviren mit anderen Eigenschaften kommen. Kommt es durch Reassortierung zum Austausch eines der Oberflächenproteine und entsteht dadurch ein Subtyp, der nicht mit dem derzeit in der menschlichen Bevölkerung zirkulierenden übereinstimmt, spricht man von Antigen-*shift* (Palese 1977). Des Weiteren treten bei Influenza-A-Viren durch die hohe Fehlerrate der viralen Polymerase (ca. 1 Fehler / 100 000 Basen) Mutationen in Genen auf, welche für virale Proteine kodieren. Eine Anhäufung von Mutationen in den Oberflächenproteinen Hämagglutinin und Neuraminidase führt zu schrittweisen Veränderungen der Antigene und damit zur Antigen-*drift*.

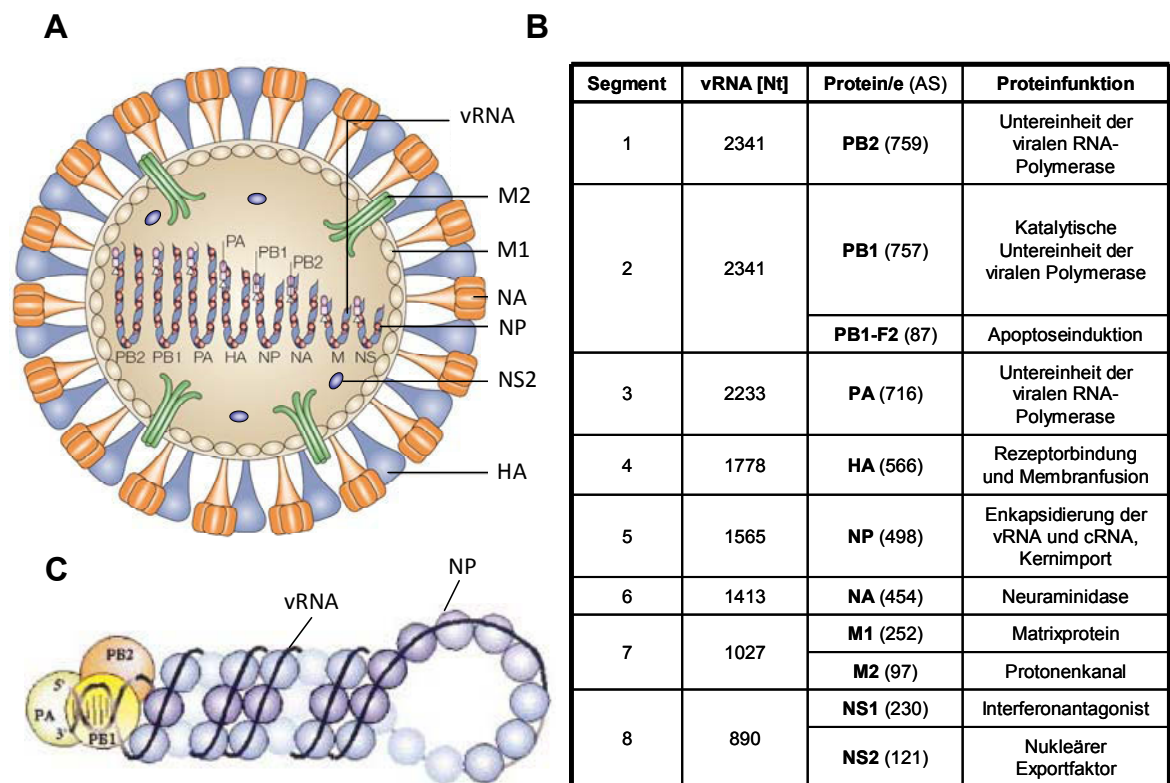
### 1.1.1 Aufbau des Viruspartikels und Genomorganisation

Die Virionen der Influenza-A-Viren besitzen eine sphärische oder filamentöse Gestalt und haben einen Durchmesser von 80-120 nm (Abb. 1.2).



**Abb. 1.2: Elektronenmikroskopische Darstellung von Influenza-A-Viruspartikeln.**  
(<http://phil.cdc.gov/phil/details.asp>)

Sie bestehen aus den acht segmentierten Nukleokapsiden, die von einer Lipidhülle umgeben sind, welche von der Wirtszelle abstammt (Kates *et al.* 1962). In der Virusmembran befinden sich die Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) sowie das M2-Ionenkanalprotein (M2) (Lamb 2001, Zebedee und Lamb 1988).



**Abb. 1.3: Schematischer Aufbau und Übersicht der acht Gensegmente eines Influenza-A-Virus.** (A) Dargestellt sind die Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA), Neuraminidase (NA) und das Protonenkanalprotein (M2), die drei RNA-Polymeraseuntereinheiten (PB1, PB2, PA), das Nukleoprotein (NP), das Matrixprotein (M1), der nukleäre Exportfaktor (NS2) und die viralen RNA-Segmente (vRNA) (modifiziert nach Horimoto und Kawaoka 2005). (B) Tabellarische Übersicht der acht Genomsegmente, der von ihnen kodierten Proteine und deren Funktion. (C) Darstellung eines RNP-Komplexes (modifiziert nach Portela und Digard 2002).

Während HA als Homotrimer die Rezeptorbindung und Fusion vermittelt, ist die als Homotetramer vorliegende NA für die Freisetzung der Virionen essentiell. Von innen wird die Virusmembran vom Matrixprotein 1 (M1) ausgekleidet, welches die Membran stabilisiert und mit den acht Segmenten des Virusgenoms assoziiert ist (Gregoriades und Frangione 1981, Wakefield und Brownlee 1989). Letztere liegen in Form von sogenannten viralen Ribonukleoproteinkomplexen (vRNPs) vor. Diese bestehen neben der genomischen RNA aus dem RNA-bindenden Nukleoprotein (NP) sowie den Polymeraseuntereinheiten PA, PB1 und PB2 (Murti *et al.* 1992, Tiley *et al.* 1994). Des Weiteren befindet sich im Virusinnern das Nichtstrukturprotein 2 (NS2, Yasuda *et al.* 1993). Das Nichtstrukturprotein 1 (NS1) und das von den meisten Influenzaviren codierte PB1-F2 Protein (Chen *et al.* 2001) sind nicht Teil des Virions und werden nur in infizierten Wirtszellen exprimiert (Palese und Shaw 2007).

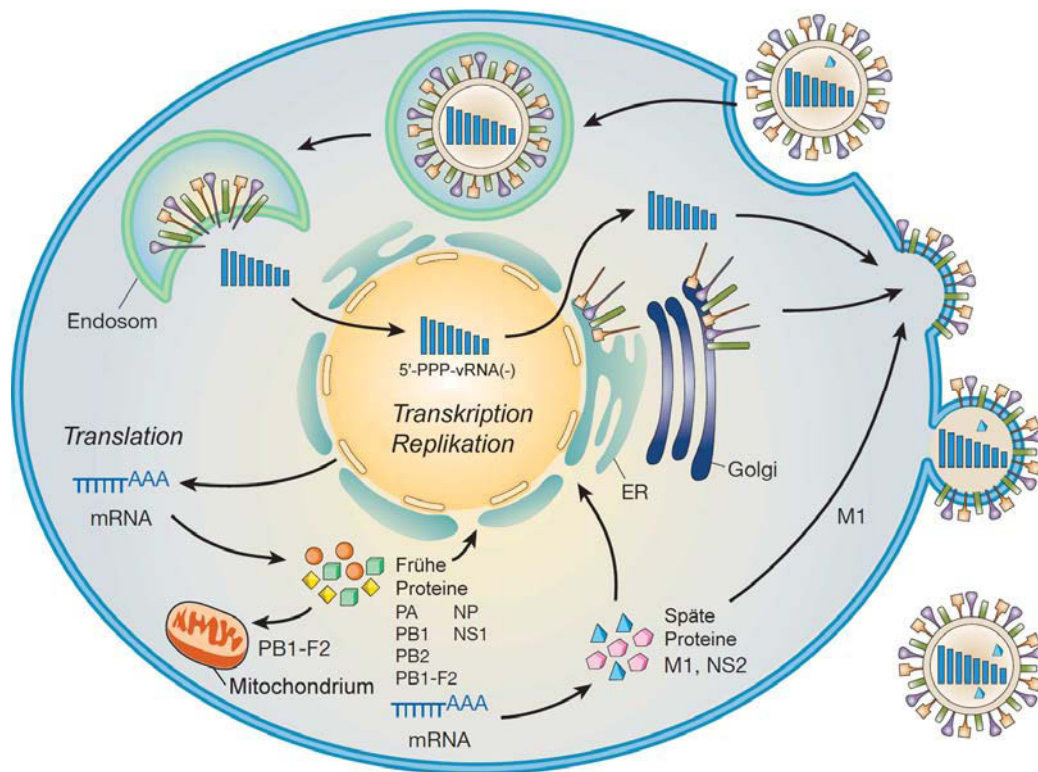
Das segmentierte Genom, bestehend aus den acht viralen RNAs (vRNAs), hat eine Größe von etwa 13 600 Basen und enthält die genetische Information der viralen Proteine (s. Abb. 1.3). Die kodierenden Regionen der einzelnen Segmente werden am 3'- und 5'-Ende von nichtkodierenden („*non-coding region*“ (NCR)) komplementären Bereichen flankiert (Desselberger *et al.* 1980). Sie bestehen aus Influenza-A-Virus-spezifischen und segmentspezifischen NCRs, wobei die ersten 12-13 Nukleotide am 3'- und 5'-Ende der Influenza-A-Virus-spezifischen NCRs als Promotorstrukturen für die Transkription und Replikation durch die virale Polymerase fungieren (Flick *et al.* 1996, Tiley *et al.* 1994).

### **1.1.2 Infektionszyklus der Influenza-A-Viren**

Der Infektionszyklus der Influenza-A-Viren beinhaltet die Adsorption an und die Aufnahme in die Wirtszelle, die Replikation des Genoms, die Synthese viraler Proteine, den Zusammenbau und das Abknospen der Virionen von der Zellmembran.

Die Adsorption der Viren erfolgt über die Bindung des HA-Proteins an endständige Sialylsäurereste glykosylierter Proteine der Wirtszelle. Nach der Adsorption kommt es durch rezeptorvermittelte Endozytose zur Aufnahme ins Zellinnere (Matlin *et al.* 1981). Durch den niedrigen pH-Wert in späten Endosomen kommt es zu einer Konformationsänderung im HA-Protein, die zur Exponierung des hydrophoben Fusionspeptides in der N-terminalen HA2-Untereinheit und zur Verschmelzung der Virus- mit der Endosomenmembran führt (Bullough *et al.* 1994, Skehel und Wiley 2000, Floyd *et al.* 2008). Zudem strömen über die vom M2 gebildeten Ionenkanäle Protonen vom Endosom in das Innere des Viruspartikels (Pinto *et al.* 1992, Sugrue und Hay 1991, Wharton *et al.* 1994). Dies führt zur Schwächung der Interaktion von M1 mit den vRNPs und damit zur Freisetzung der vRNPs ins Zytoplasma (Helenius 1992). Die Replikation der Influenzaviren findet im Zellkern statt (Martin und Helenius 1991b, Whittaker 2001). Daher werden die vRNPs unter Vermittlung der Kernlokalisierungssequenzen des NPs und der Polymerasen durch Importin- $\alpha$  erkannt und aktiv in den Zellkern transportiert (O'Neill *et al.* 1995, Cros *et al.* 2005, Whittaker *et al.* 1996, Wang *et al.* 1997).





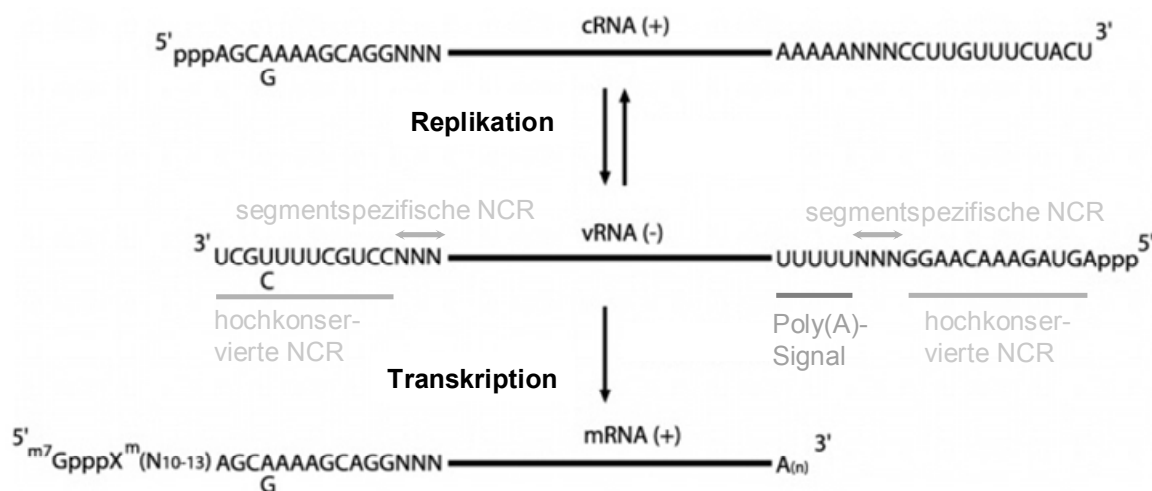
**Abb. 1.4: Schematische Übersicht des Infektionszyklus der Influenzaviren.** Nach rezeptorvermittelter Endozytose werden die viralen Ribonukleoproteinkomplexe (vRNPs) ins Zytoplasma freigesetzt und in den Zellkern transportiert, wo es zur Replikation und Transkription kommt. Die virale mRNA wird zur Translation ins Zytoplasma exportiert. Frühe virale Proteine, die für die Replikation und Transkription benötigt werden, werden zurück in den Kern transportiert. Späte Proteine wie M1 und NS2 vermitteln den Kernexport der neu synthetisierten vRNPs. Der Zusammenbau und das Knospen der Viren erfolgt an der Plasmamembran (modifiziert nach Neumann *et al.* 2009).

Dort erfolgt die Transkription der vRNA in mRNA durch den viralen Polymerasekomplex. Dabei dienen 12-14 Nukleotide lange 5'-m<sup>7</sup>Gppp-Enden, die von dem viralen Polymerasekomplex von neu synthetisierter Wirtszell-mRNA geschnitten werden, als Primer („cap snatching“, Krug *et al.* 1979, Plotch *et al.* 1981, Fechter *et al.* 2003, Li *et al.* 2001, Dias *et al.* 2009). Die viralen mRNAs werden durch wiederholtes Ablesen einer Poly(U)-Sequenz vor dem 5'-Ende der vRNA polyadenyliert (Robertson *et al.* 1981, Luo *et al.* 1991, Poon *et al.* 1999, Pritlove *et al.* 1998). Die kollinearen mRNAs der Segmente 7 und 8 werden gespleißt, wodurch zusätzliche mRNAs für M2 und NS2 generiert werden. Die viralen mRNAs werden in das Zytoplasma transportiert, wo sie an Ribosomen translatiert werden.

Zunächst werden vor allem NP und NS1 transkribiert und translatiert, in späteren Stadien werden vermehrt HA, NA und M1 synthetisiert (Smith und Hay

1982, Shapiro und Krug 1988). Die Synthese der Oberflächenproteine HA, NA und M2 erfolgt am rauen endoplasmatischen Retikulum, alle weiteren Proteine werden an freien Ribosomen synthetisiert. Das Protein PB1-F2, welches nicht von allen Influenzaviren codiert wird, wird über einen alternativen Leserahmen von der PB1-mRNA translatiert (Chen *et al.* 2001). Aufgrund ihrer Kernlokalisierungssignale werden die Polymeraseuntereinheiten PB1, PB2 und PA, sowie die Proteine NP und NS1 in den Zellkern transportiert (Smith *et al.* 1987).

Im Infektionsverlauf kommt es zum Umschalten von Transkription zur Replikation der vRNA. Dies geschieht über den nukleären NP-Gehalt (Shapiro und Krug 1988, Skorko *et al.* 1991, Vreede *et al.* 2004) und/oder durch ansteigende NS2-Konzentrationen (Robb *et al.* 2009). Für die Replikation des viralen Genoms wird zunächst primerunabhängig eine cRNA transkribiert, die der vRNA komplementär ist. Diese cRNA dient als Matrize für die Synthese neuer vRNAs, die in der späten Infektionsphase in Form von vRNPs durch



**Abb. 1.5: Darstellung der verschiedenen Influenzavirus-RNAs während der Replikation.** Die virale RNA (vRNA) mit ihren hochkonservierten Influenza-A-spezifischen nichtkodierenden Regionen (NCRs) und den segmentspezifischen NCRs ist in der Mitte abgebildet. Von ihr erfolgt die Transkription der messenger-RNA (mRNA) und die Synthese einer vollständigen komplementären Kopie der vRNA (cRNA), die als Matrize für die Replikation der vRNA dient (modifiziert aus Lamb 2001).

Wechselwirkung mit M1 und NS2 über den zellulären CRM1-abhängigen RNA-Exportweg in das Zytoplasma transportiert werden (Martin und Helenius 1991a, Ye *et al.* 1999, Baudin *et al.* 2001, O'Neill *et al.* 1998, Boulo *et al.* 2007). Die Oberflächenproteine werden vom rauen endoplasmatischen Retiku-

lum über den Golgi-Apparat und das *trans*-Golgi-Netzwerk zur Zellmembran transportiert. Dabei werden die Proteine glykosyliert, zu funktionellen Trimeren (HA) bzw. Tetrameren (NA und M2) angeordnet und schließlich im *cis*-Golgi-Netzwerk die Cysteinreste des HA und M2 palmitoyliert (Sugrue *et al.* 1990, Veit und Schmidt 1993, Lamb 2001). HA und NA sammeln sich in sogenannten „*lipid rafts*“ (sphingolipid- und cholesterinhaltige Membranbereiche) an, während M2 am Rande dieser Bereiche akkumuliert (Leser und Lamb 2005).

Nach welchen Prinzipien die vRNPs in die neuen Virionen eingebaut werden, ist noch immer nicht vollständig geklärt. Sowohl eine zufällige Verpackung der verschiedenen Segmente (Luo *et al.* 1991) als auch eine spezifische Verpackung über segmentspezifische Signale (Marsh *et al.* 2008, Noda *et al.* 2006, Odagiri und Tashiro 1997) wird diskutiert, wobei sich für letztere die Hinweise häufen. Die Abschnürung der neuen Virionen von der apikalen Membran erfolgt wahrscheinlich durch ein Zusammenspiel verschiedener Proteine. So konnte einerseits gezeigt werden, dass transfiziertes M1 allein die Knospung virusähnlicher Partikel veranlasst (Gomez-Puertas *et al.* 2000), andererseits zeigen neuere Studien, dass HA zusammen mit NA das Abschnüren der Virionen induziert (Chen *et al.* 2007). Durch die Neuraminidaseaktivität des NA-Proteins werden Sialinsäurereste von der Membranoberfläche abgespalten, was eine Freisetzung der Virionen ermöglicht und eine Readsorption verhindert (Palese *et al.* 1974, Barman und Nayak 2000, Nayak *et al.* 2004). Das HA-Protein wird zunächst als HA0-Vorläuferprotein gebildet. Die Spaltung dieses HA0-Vorläuferproteins in HA1 und HA2 ist die Voraussetzung für die Membranfusion und damit für die Infektion weiterer Zellen (Scheid und Choppin 1974, Klenk und Rott 1988, Kido *et al.* 1999). Bei hochpathogenen H5- und H7-Viren erfolgt die Spaltung an einem multibasischen Motiv durch die Subtilisin-ähnliche Protease Furin bereits intrazellulär im *trans*-Golgi-Netzwerk (Stieneke-Grober *et al.* 1992). Als mögliche HA0-prozessierende Proteasen, die monobasische Motive der humanpathogenen und niedrigpathogenen Viren erkennen, wurden zunächst exogene Proteasen wie Pankreastrypsin (Klenk *et al.* 1975), Plasmin aus Kalb und Hühnerserum (Lazarowitz *et al.* 1973), Trypsin Clara aus Rattenlungen (Kido *et al.* 1992) und Miniplasmin aus Rattenlungen (Murakami *et al.* 2001) beschrieben. Neue-

re Studien identifizierten die zellulären Proteasen TMPRSS 2 („*transmembrane protease serine*“) und HAT („*type II membrane protein human airway trypsin-like protease*“) in humanen respiratorischen Zellen (Bottcher *et al.* 2006). Neben zellulären Proteasen können auch mikrobielle Proteasen bei bakteriellen Infektionen der Atemwege HA0 spalten (Tashiro *et al.* 1987). Welche dieser Proteasen in der humanen Lunge wirklich an der Spaltung des HA-Proteins beteiligt sind, ist noch immer unklar.

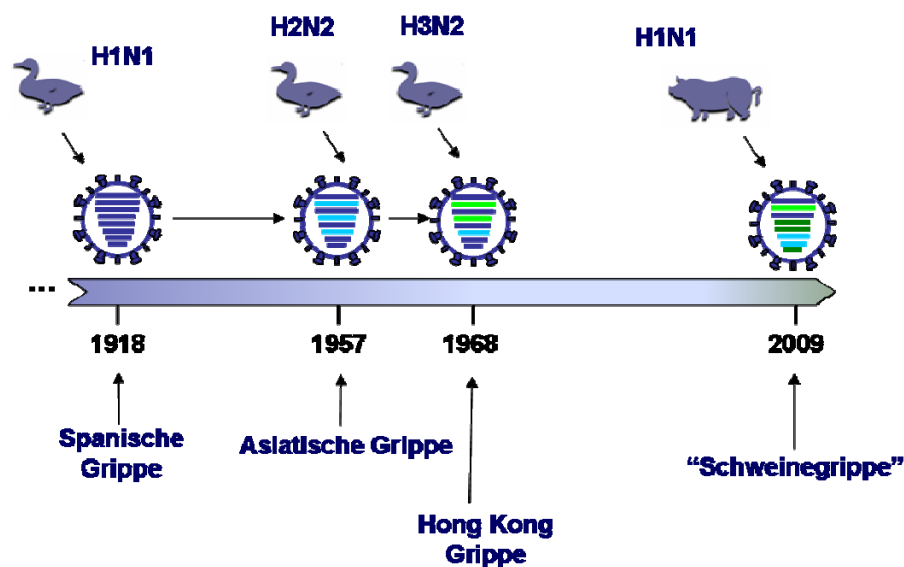
Im Laufe des Infektionszyklus kommt es zur Inhibierung der zellulären und Verstärkung der viralen Proteinsynthese. Durch die Bindung von NS1 an die 5'NCR der viralen mRNA und den Translationsinitiationsfaktor eIF4GI kommt es zur Verstärkung der viralen mRNA Translation (Park und Katze 1995, Aragon *et al.* 2000, Burgui *et al.* 2003). Gleichzeitig bindet NS1 an CPSF („*cleavage and polyadenylation specific factor*“) was zur Inhibition des Spleißens und Polyadenylierens zellulärer (prä)-mRNA und deren Kernexport führt (Fortes *et al.* 1994, Nemeroff *et al.* 1998, Chen *et al.* 1999).

PB1-F2 interagiert mit PB1 und führt zu einer moderaten Steigerung der viralen Polymeraseaktivität (Mazur *et al.* 2008). Zudem scheint es die Immunantwort der Wirtszelle durch Induktion von Apoptose vor allem in Monozyten zu modulieren und wird mit einer Erhöhung der Pathogenität assoziiert (Chen *et al.* 2001, Zamarin *et al.* 2006).

### **1.1.3 Pathogenese und Epidemiologie**

Influenza-A-Viren sind zusammen mit den Influenza-B-Viren für die jährlich auftretende klassische Virusgrippe (Influenza) beim Menschen verantwortlich, die im Schnitt jährlich 8.000 - 10.000 Todesfälle in Deutschland verursacht (AGI 2008). Die Viren werden meist über Tröpfcheninfektion übertragen und infizieren zunächst Epithelzellen der Mund- Nasen- und Rachenschleimhaut (Alford *et al.* 1966, Wright *et al.* 2007). Nach einer Inkubationszeit von 1-3 Tagen treten die typischen Symptome wie Kopf- und Gliederschmerzen, Husten, Schüttelfrost und hohes Fieber auf. Bei schweren Krankheitsverläufen, die gehäuft bei älteren und immunsupprimierten Personen zu beobachten sind, kommt es auch zur Ausbreitung der Viren bis in den unteren Respirations-trakt. Dabei kommt es zu Zellzerstörungen, Bildung von Hyalinmembranen

und Ödemen und zur verstärkten Einwanderung von Neutrophilen und Monozyten. Diese Vorschädigung der Epithelien erleichtert eine Infektion mit anderen Erregern, so dass es häufig zu einer bakteriellen Sekundärinfektion kommt (Sprenger *et al.* 1993, Simonsen *et al.* 1997). Derzeit stehen zwei verschiedene Wirkstoffklassen antiviraler Medikamente zur Verfügung. Zum einen die Adamantane (Amantadin und Rimantadin), die die Ionenkanalfunktion des M2-Proteins inhibieren, und zum anderen die Neuraminidaseinhibitoren Oseltamivir (Tamiflu) und Zanamivir (Relenza). Mittlerweile sind jedoch adamantanresistente H3N2-Viren und oseltamivirresistente H1N1-Viren weit verbreitet.



**Abb. 1.6: Übersicht der Influenzapandemien.** Die spanische Grippe wurde wahrscheinlich durch die Übertragung eines aviären Virus auf den Menschen ausgelöst. 1957 kam es durch die Einführung von HA- (H2), NA- (N2) und PB1-Genen eines aviären Virus in die Bevölkerung zur Asiatischen Grippe. Eine weitere Reassortierung eines aviären H3 HA- und PB1-Gens führte zur Hong Kong Grippe 1968. 2009 löste eine porzine Quadrupelreassortante die erste Pandemie des 21. Jahrhunderts aus.

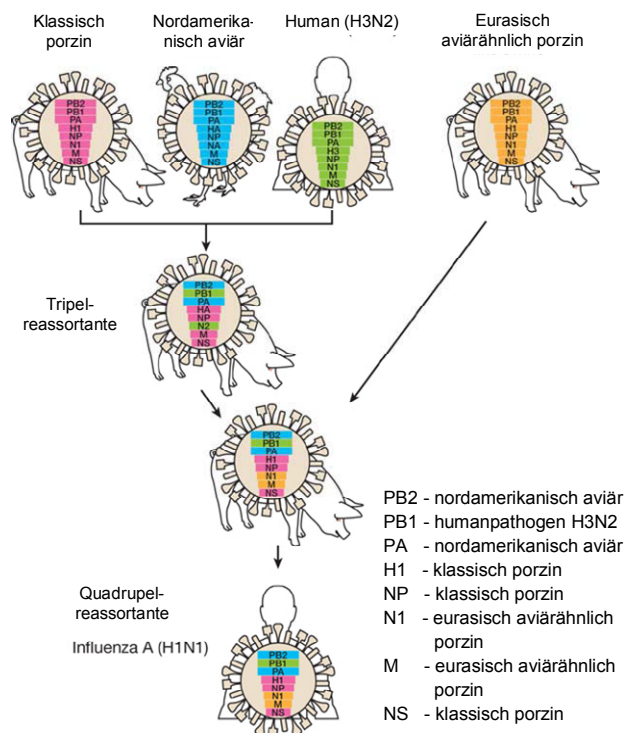
Influenza-A-Viren treten in Form von saisonalen Epidemien auf, die überwiegend durch die seit 1977 zirkulierenden Subtypen H1N1 und H3N2 verursacht werden. Daneben wurden in diesem und im letzten Jahrhundert vier große Pandemien dokumentiert (Abb. 1.6), die entweder durch die direkte Übertragung eines aviären Virus auf den Menschen oder durch Reassortierung verschiedener Influenzaviren hervorgerufen wurden.

So wurde die „Spanische Grippe“ von 1918, der mehr als 40 Millionen Menschen zum Opfer fielen, wahrscheinlich durch die Übertragung eines aviären H1N1-Virus auf den Menschen ausgelöst (Taubenberger *et al.* 1997). Dagegen führte die Reassortierung der nach der Spanischen Grippe zirkulierenden H1N1-Viren mit einem aviären H2N2-Virus (Segmente HA, NA und PB1) zur Auslösung der „Asiatischen Grippe“ von 1957 (Kawaoka *et al.* 1989, Scholtissek *et al.* 1978). Eine weitere Reassortierung dieser H2N2-Viren mit einem aviären H3-Virus (HA und PB1 Segment) führte zur „Hong Kong Grippe“ von 1968 (Kawaoka *et al.* 1989). Am 11. Juni 2009 rief die WHO mit dem weltweiten Auftreten der sogenannten „Schweinegrippe“ die erste Pandemie dieses Jahrhunderts aus (1.1.4). Bis heute zirkulieren die pandemischen H1N1-Viren in der Bevölkerung, so dass ihre Antigene zusammen mit denen der saisonalen H3N2- und Influenza-B-Viren die Komponenten der Grippeimpfung bilden (<http://influenza.rki.de/Saisonberichte/2009.pdf>).

### **1.1.4 Die Epidemiologie pandemischer H1N1-Viren 2009**

Epidemiologische Daten zeigen, dass ein Ausbruch von influenzaähnlichen respiratorischen Erkrankungen in La Gloria, Mexico, im Februar 2009 begann (Fraser *et al.* 2009). Anfang April registrierten die Gesundheitsämter in Mexiko hohe Fallzahlen von Pneumonien und influenzaähnlichen Symptomen. Mitte April wurde in zwei Patientenproben in Californien das H1N1-Virus 2009 nachgewiesen. Das pandemische H1N1-Virus 2009 (auch fälschlicherweise als „Schweinegrippevirus“ bezeichnet) verbreitete sich sehr effizient von Mensch zu Mensch und innerhalb weniger Wochen in über 30 Länder.

Das Virus ist eine Quadrupelreassortante, die durch die Reassortierung eines eurasischen vogelähnlichen Schweinevirus mit einer porzinen Tripelreassortante aus einem humanpathogenen H3N2-Virus (PB1, NA), einem klassischen Schweinevirus (NS, NP, M und HA) und einem nordamerikanischen aviären Virus (PB2, PA) entstand (Dawood *et al.* 2009, Neumann *et al.* 2009, Abb. 1.7). Diese Tripelreassortanten stellen in USA die am häufigsten vorkommenden Viren in Schweinen dar und führten seit 2005 bereits zu sporadischen Infektionen beim Menschen (Shinde *et al.* 2009, Yassine *et al.* 2009).



**Abb. 1.7: Schematische Darstellung der Entstehung der pandemischen H1N1-Viren.** In den 1990er Jahren kam es zur Reassortierung eines humanen H3N2, eines nordamerikanischen aviären und eines klassischen Schweinevirus, die zur Entstehung von tripelreassortanten Schweineviren führte, die in der nordamerikanischen Schweinepopulation zirkulierten. Durch eine Reassortierung mit einem eurasisch aviärähnlichen porzinen Virus entstanden die pandemischen H1N1-Viren (modifiziert nach Neumann *et al.* 2009).

### 1.1.5 Die Epidemiologie hochpathogener H5N1-Viren

Hochpathogene aviäre Viren wurden erstmals 1997 mit humanen respiratorischen Infektionen assoziiert, als es während eines Krankheitsausbruchs bei Geflügel in Hong Kong zu einer direkten Übertragung eines rein aviären H5N1-Virus auf den Menschen kam. Insgesamt kam es zur Infektion von 18 Individuen, von denen sechs verstarben (Claas *et al.* 1998, de Jong *et al.* 1997 Subbarao *et al.* 1998 Yuen *et al.* 1998). Dieser Ausbruch konnte durch die Schlachtung aller Vögel auf den Geflügelfarmen und -märkten in Hong Kong unter Kontrolle gebracht werden. Obwohl in Routineüberwachungen immer wieder H5N1-Viren im Geflügel zwischen 1999 und 2003 nachgewiesen wurden (Ellis *et al.* 2004, Guan *et al.* 2002, Sims *et al.* 2003), wurde kein weiterer humaner Fall gemeldet, bis im Februar 2003 das Virus bei zwei Familienmitgliedern isoliert wurde, von denen eins verstarb (Peiris *et al.* 2004). Seit Ende 2003 verbreiteten sich die H5N1-Viren in weiteren asiatischen Ländern

und führten zur Schlachtung von über 150 Millionen Hühnern und zu sporadischen Infektionen beim Menschen. Seitdem haben sich die Viren von Asien bis nach Europa und Afrika ausgebreitet (Ducatez *et al.* 2006). In letzter Zeit wurde das Virus in domestizierten Vögeln und Wildvögeln in Zentralasien, Afrika und Europa nachgewiesen (Kilpatrick *et al.* 2006) und aktuell treten in Ägypten, Indonesien und Kambodscha sporadische Infektionen beim Menschen auf. Bis zum 13.05.2011 wurden insgesamt 553 humane Infektionen, die bei 306 Personen zum Tode führten, nachgewiesen ([http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/country/cases\\_table\\_2011\\_05\\_13/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2011_05_13/en/index.html)). Während die Mortalitätsrate beim Ausbruch von 1997 bei etwa 33% lag, zeigten H5N1-Infektionen nach 2003 mit etwa 60% eine deutlich höhere Mortalitätsrate. Obwohl mehrere verschiedene H5N1-Virusfamilien auftraten, kam es nicht zu einer Übertragung von Mensch zu Mensch. Mehrere Studien zeigten, dass hochpathogene aviäre H5N1-Viren bei Patienten hauptsächlich im unteren humanen Respirationstrakt replizieren und die Viruslast mit dem Ausgang der Infektion korreliert (de Jong *et al.* 2006, Tran *et al.* 2004). Humane H5N1-Infektionen führen neben Fieber und respiratorischen Symptomen zu schweren Pneumonien und Diarrhöen und zeichnen sich durch hohe Cytokin- und Chemokinlevel im Serum aus (de Jong *et al.* 2006, Peiris *et al.* 2004, To *et al.* 2001).

### **1.2 Speziesbarriere der Influenzaviren**

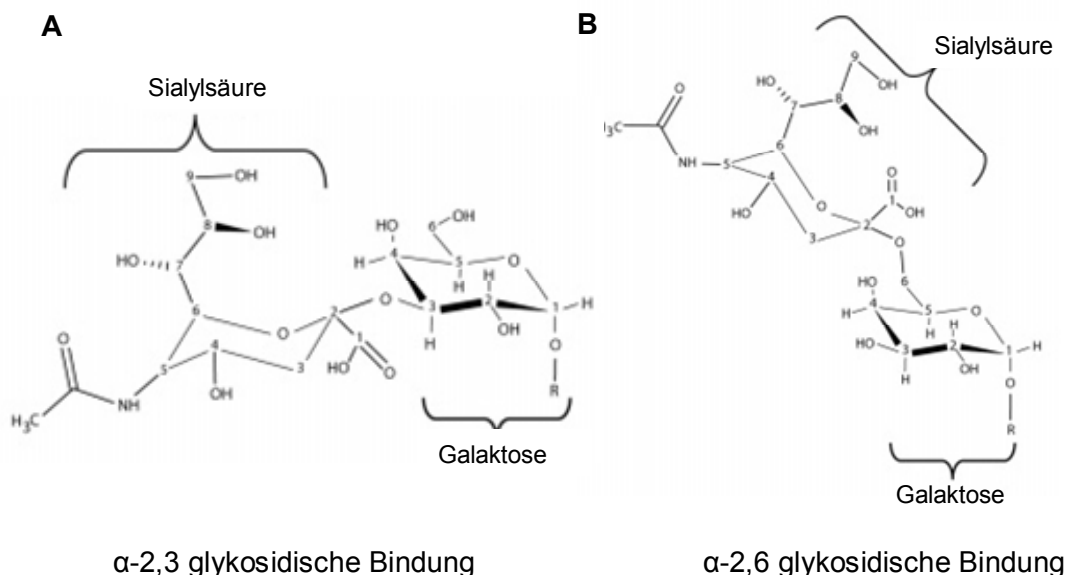
Influenzaviren wurden aus vielen verschiedenen Wirten wie Schweinen, Vögeln und Menschen isoliert (Webster *et al.* 1992). Interspeziestransmissionen werden nur sehr selten beobachtet und aviäre Viren replizieren in experimentell infizierten Personen nur sehr ineffizient (Beare und Webster 1991). Dennoch kam es seit 1997 immer wieder zur direkten Übertragung aviärer H5N1-Viren vom Vogel auf den Menschen. Die molekularen Faktoren der Speziesbarriere und der Wirtsadaptation der Influenzaviren sind bis heute noch nicht vollständig geklärt. Molekulare Faktoren, die der Speziespezifität von Viren zu Grunde liegen können, schließen z. B. das Vorhandensein passender Rezeptoren und/oder Transkriptions- oder anderer benötigten Wirtsfaktoren ein sowie die Immunantwort des Wirtes. Für humane Coronaviren des Serotyps 1



konnte gezeigt werden, dass die Expression des Rezeptors ein Hauptmerkmal der Speziesbarriere darstellt. So wurde beschrieben, dass die genomische RNA der Viren bei Transfektion in verschiedensten Zellen infektiös ist, Virionen jedoch nur humane und feline Zellen oder Zellen, die mit dem Rezeptor zuvor transfiziert worden waren, infizieren können (Yeager *et al.* 1992). Im Gegensatz dazu konnte für Poxviren gezeigt werden, dass sie sowohl in permissive als auch in nicht permissive Zellen eindringen können und es in nicht permissiven Zellen erst intrazellulär zu einer Restriktion kommt (McFadden 2005). Die Immunantwort des Wirtes trägt bei der Virusfamilie der *Paramyxoviridae* zur Speziespezifität bei. So ist das Simianvirus 5 in der Lage die IFN-Antwort über Degradation von STAT1 in humanen, Affen- und Hundezellen zu hemmen, jedoch nicht in murinen Zellen (Didcock *et al.* 1999, Didcock *et al.* 1999).

Für Influenza-A-Viren sind bisher verschiedene Faktoren wie z. B. die Rezeptorspezifität des HA-Proteins und die Aktivität der viralen Polymerase als Determinanten der Speziesbarriere diskutiert worden.

Die HA-Proteine aviärer Influenzaviren binden vorzugsweise an  $\alpha$ -2,3-verlinkte Sialylsäurereste (SA $\alpha$ -2,3Gal), die im Gastrointestinaltrakt von Geflügel



**Abb. 1.8: Darstellung der  $\alpha$ -2,3- und  $\alpha$ -2,6-glykosidischen Bindung.** Beim aviären Rezeptor (A) ist das C2-Atom der Sialylsäure mit dem C3-Atom der Galaktose verbunden, während die Bindung beim humanen Rezeptor über das C2-Atom der Sialylsäure und das C6-Atom der Galaktose erfolgt (B) (Wright *et al.* 2007).

und Wildvögeln als Bestandteil der Glykoproteine vorkommen (Ito *et al.* 1998). Im Gegensatz dazu erkennen HA-Proteine der humanen Influenzaviren bevorzugt  $\alpha$ -2,6-verlinkte Sialylsäurereste (SA $\alpha$ -2,6Gal), die im oberen Respirationstrakt von Mensch und Frettchen exprimiert sind (Shinya *et al.* 2006, Connor *et al.* 1994, Matrosovich *et al.* 2000, Leigh *et al.* 1995). Dennoch können hochpathogene aviäre Viren Menschen infizieren und zu einer lethalen Infektion führen (Claas *et al.* 1998, Subbarao *et al.* 1998, Fouchier *et al.* 2004). Eine mögliche Erklärung dafür lieferte die Erkenntnis, dass Zellen im unteren humanen Respirationstrakt auch SA $\alpha$ -2,3Gal tragen (Shinya *et al.* 2006, van Riel *et al.* 2006).

Trotzdem scheint das HA aviärer Stämme für eine effiziente Mensch-zu-Mensch-Übertragung präferenziell den humanen Rezeptor erkennen zu müssen. Diese Aussage wird unterstützt durch die Tatsache, dass frühe Isolate der Pandemien von 1918, 1957 und 1968 an SA $\alpha$ -2,6Gal binden, obwohl ihre HA-Proteine aviären Ursprungs sind (Gamblin *et al.* 2004, Gamblin *et al.* 2004, Matrosovich *et al.* 2000). Es ist bekannt, dass ein Aminosäureaustausch im HA1-Protein von H2 oder H3 (Gln226Leu, Gly228Ser) zu einer Änderung der Rezeptorspezifität von  $\alpha$ -2,3 zu  $\alpha$ -2,6 führt (Rogers und Paulson 1983, Naeve *et al.* 1984, Connor *et al.* 1994). Für H5N1-Viren zeigten dagegen Microarrayanalysen dass der Austausch dieser AS (Gln226Leu und Gly228Ser) zwar zu einer verringerten  $\alpha$ -2,3-Bindung führt aber keine deutliche Änderung der Bindungsaffinität für  $\alpha$ -2,6 zu erkennen war (Stevens *et al.* 2006). Bei H1-Viren sind Asp190 mit einer Rezeptorpräferenz für SA $\alpha$ -2,6Gal assoziiert, während die bei aviären Viren vorkommende Glutaminsäure für eine Bindung an SA $\alpha$ -2,3Gal verantwortlich ist (Gamblin *et al.* 2004, Gamblin *et al.* 2004, Matrosovich *et al.* 2000, Kobasa *et al.* 2004).

Eine weitere Determinante der Speziesbarriere ist die virale Polymerase (Neumann und Kawaoka 2006). Dabei spielt vor allem die Aminosäure an der Position 627 im PB2-Protein eine große Rolle (Subbarao *et al.* 1993). Im PB2-Protein humanpathogener Viren findet sich an dieser Stelle meist ein Lysin (K627), während bei aviären Viren meist ein Glutamin (E627) vorhanden ist (Chen *et al.* 2006). PB2 E627 korreliert mit einer verminderten RNA-Bindungsfähigkeit, Polymeraseaktivität, Replikation und Pathogenität der Viren

in Säugerzellen und Mäusen (Kuzuhara *et al.* 2009, Hatta *et al.* 2001, Salomon *et al.* 2006 Shinya *et al.* 2004). Des Weiteren beeinflusst die AS 627 in PB2 die Temperatursensitivität der Viren. So replizieren Viren mit PB2 K627 besser bei niedrigeren Temperaturen um 33°C wie sie im oberen humanen Respirationstrakt vorkommen, während Viren mit PB2 E627 bei 41°C (entspricht der Körpertemperatur von Vögeln) besser replizieren (Massin *et al.* 2001, Hatta *et al.* 2007). Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass der Austausch K627E die Übertragbarkeit humaner Influenzaviren in Meerschweinchen reduziert (Steel *et al.* 2009). Dennoch führt PB2 K627 weder zu einer vermehrten Virulenz im Frettchen noch korreliert es immer mit einem schwerwiegenden Krankheitsverlauf beim Menschen (Govorkova *et al.* 2005, Maines *et al.* 2005). Zudem weisen die pandemischen H1N1-Viren von 2009, die sehr effizient im Menschen replizierten und von Mensch zu Mensch übertragen wurden, die aviäre Signatur E627 auf.

### **1.3 Das nicht adaptive Immunsystem**

Im Vergleich zum adaptiven Immunsystem, welches sich erst im Laufe der Phylogenese der Wirbeltiere entwickelte, stellt das nicht adaptive oder auch als „angeboren“ bezeichnete Immunsystem das evolutionär gesehen ältere System dar, welches bei fast allen Lebewesen vorhanden ist. Es spielt eine wesentliche Rolle bei der schnellen und effektiven Kontrolle viraler Infektionen und der Initiierung der adaptiven Immunität. Zum nicht adaptiven Immunsystem gehören sowohl anatomische und physiologische Barrieren wie Epithelien als auch das Komplementsystem und spezialisierte Zellen. Zu den spezialisierten Zellen des adaptiven Immunsystems zählen vor allem Makrophagen, dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten und natürliche Killerzellen. Aktiviert wird das angeborene Immunsystem durch sogenannte PAMPs („*pathogen associated molecular patterns*“), bestimmte auf Pathogenen wiederkehrende Strukturen wie Lipopolysaccharide und virale Nukleinsäuren, die von spezifischen Rezeptoren („*pattern recognition receptors*“ (PRRs)) erkannt werden. PRRs sind nicht nur auf spezialisierten Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert sondern z. B. auch auf Epithelzellen. Letztere produzieren am Infektionsort eine erste Cytokinwelle, die zu einer lokalen und systemischen

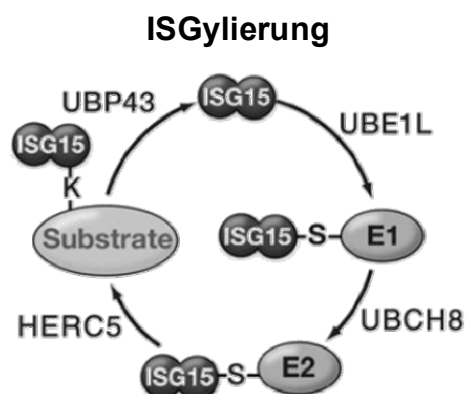
Antwort führt (Van Reeth 2000). Zu den frühen Cytokinen gehören Interferon- $\alpha$ , Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin (IL)-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , denen IL-6 und verschiedene chemotaktische Cytokine wie IL-8 folgen (Bielefeldt-Ohmann 1995). Die induzierten Cytokine aktivieren einerseits spezialisierte Immunzellen wie dendritische Zellen und natürliche Killerzellen (Biron *et al.* 1999, Gallucci *et al.* 1999, Le Bon *et al.* 2001) andererseits führen sie in den umliegenden Epithelzellen zur Aktivierung antiviral wirkender Proteine (Samuel 2001). Dabei spielen vor allem die induzierten Typ I Interferone wie Interferon- $\alpha$  eine wichtige Rolle (1.3.1).

### 1.3.1 Das Typ I Interferonsystem

Die Interferone wurden erstmals 1957 beschrieben, als Isaacs und Lindemann herausfanden, dass Überstände infizierter Zellen ein Protein enthalten, welches andere Zellen für eine Virusinfektion resistent machen (Isaacs und Lindenmann 1957). Heute unterscheidet man Interferone (IFN) der Typen I, II und III. Letztere wurden erst 2003 identifiziert und als IFN- $\lambda$ 1 (IL-29), IFN- $\lambda$ 2 (IL-28A) und IFN- $\lambda$ 3 (IL-28B) bezeichnet (Kotenko *et al.* 2003, Sheppard *et al.* 2003). Sie weisen überlappende Funktionen mit den Typ I IFN auf (siehe weiter unten). Als einziges bekanntes Typ II IFN gilt IFN- $\gamma$ , welches vor allem von Makrophagen und anderen Immunzellen gebildet wird und zur Initiierung der adaptiven Immunantwort beiträgt (Gessani und Belardelli 1998). Zu den Typ I IFN gehören IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$  und IFN- $\omega$ , die alle an den gleichen IFN- $\alpha/\beta$ -Rezeptor (IFNAR) binden und antiviral wirken (Sommereyans *et al.* 2008, Muller *et al.* 1994, Seo und Hahn 2010, Hiscott 2007). Wie wichtig die Typ I IFN-Antwort ist, wird durch die verstärkte Anfälligkeit von IFNAR-defizienten Mäusen für Virusinfektionen (Kamijo *et al.* 1994, Hwang *et al.* 1994) deutlich. Die Aktivierung des Typ I IFN-Systems erfolgt über „Toll-like“ Rezeptoren (TLR) oder RIG-I („retinoic acid-inducible gene I“ (Seth *et al.* 2006, Baum und Garcia-Sastre 2010)). In Epithelzellen fungiert RIG-I als cytosolischer Rezeptor für doppelsträngige RNA oder einzelsträngige 5'-phosphorylierte RNA (Yoneyama *et al.* 2004, Hornung *et al.* 2006, Pichlmair *et al.* 2006). Die Bindung letzterer führt vermutlich im Rahmen einer Influenza-virusinfektion zur Initiierung der Typ I IFN-Antwort. Nach Aktivierung wirkt

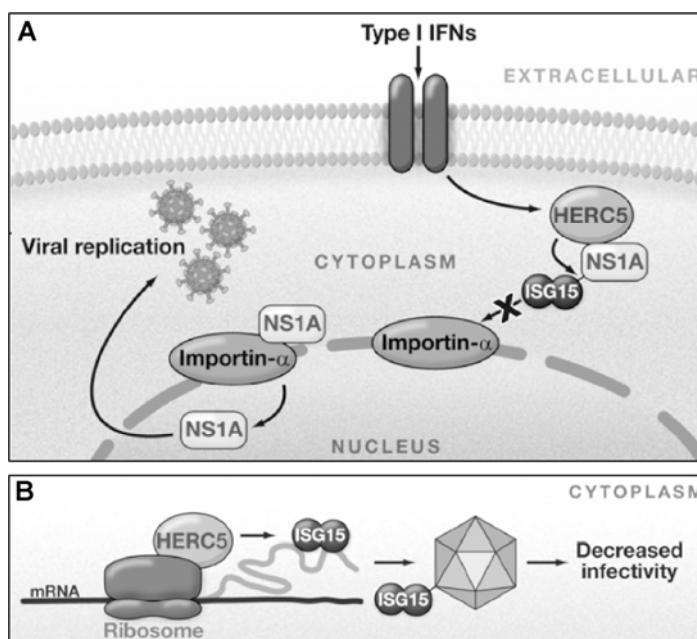
RIG-I über den Adapter IPS-1 zur Aktivierung von IFN regulatory factor 3 (IRF3) und zur Produktion von IFN (Wolff und Ludwig 2009). Während RIG-I entscheidend für die Virusdetektion in Epithelzellen und Fibroblasten ist, erfolgt die Erkennung viraler RNA in Immunzellen wie den plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) über TLR7 in Endosomen (Lund *et al.* 2004, Diebold *et al.* 2004, Kato *et al.* 2005).

Sekretiertes Typ I IFN wirkt auto- und parakrin und führt über die Bindung an IFNAR zur Aktivierung des Jak-STAT Signalweges. Dieser führt zur Bildung des Transkriptionsfaktors ISGF3 (bestehend aus STAT1, STAT2 und IRF-9), der zur Induktion der IFN stimulierten Gene (ISGs) wie 2'-5'Oligoadenylat Synthetase (OAS), Protein Kinase R (PKR), Orthomyxovirus resistente GTPase (MxA) und ISG15 führt (Stark *et al.* 1998, Wolff und Ludwig 2009). Die translatierten Proteine dieser ISGs können die Replikation und die Ausbreitung der Viren durch Degradierung der viralen RNA (OAS), Inhibierung der zellulären Translationsmaschinerie (PKR) und Blockierung der viralen Polymerase (MxA) verhindern (Garcia-Sastre und Biron 2006, Sadler und Williams 2008, Samuel 2001). Das 15 kDa große ubiquitinähnliche Protein ISG15 ist eines der meist induzierten ISGs nach Virusinfektion und fungiert ebenfalls als antiviral wirkendes Molekül gegen Influenzaviren (Lenschow *et al.* 2007). Wie ubiquitinähnliche Proteine wird auch ISG15 an Zielproteine über ein C-terminales Gly-Gly Motiv gebunden. Dieser als ISGylierung bezeichnete Prozess erfolgt in einer dreistufigen enzymatischen Kaskade (Abb. 1.9).



**Abb. 1.9: ISGylierung.** ISG15 wird wie Ubiquitin in einer dreistufigen Enzymkaskade an verschiedene Substrate gebunden. Zunächst wird ISG15 ATP-abhängig von E1 (UBE1L) aktiviert und auf E2 (UBCH8) übertragen. Durch E3 (HERC5), welches an Ribosomen gebunden ist, wird ISG15 über ein C-terminales Gly-Gly Motiv an ein Lysin des Zielproteins konjugiert (Skaug und Chen 2010).

Bis heute sind über 150 Proteine als putative ISGylierungsziele identifiziert worden (Zhao *et al.* 2005). Unter ihnen befinden sich auch selbst durch IFN-stimulierte Proteine wie MxA und RIG-I. Dennoch ist wenig über die funktionelle Konsequenz einer ISGylierung bekannt. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass ISG15 knockout Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen sensibler gegenüber Infektion mit Sindbisvirus, Herpesviren und Influenza-A- und -B-Viren sind (Lenschow *et al.* 2007). Diese antivirale Aktivität konnte für Sindbisvirus, Influenza-A- und Influenza-B-Viren mit der ISG15-Konjugation in Verbindung gebracht werden (Lenschow *et al.* 2007, Lai *et al.* 2009). Es konnte gezeigt werden, dass die ISGylierung des zellulären Proteins 4EHP zu einer verstärkten Affinität zu mRNA Kappen führt und somit zur Inhibierung der viralen RNA Translation beitragen könnte (Okumura *et al.* 2007). Des Weiteren wurden auch virale Proteine als Zielstrukturen einer ISGylierung implementiert. So wurde gezeigt, dass das NS1-Protein mit HERC5 interagiert und



**Abb. 1.10: Mögliche antivirale Mechanismen der ISGylierung.** (A) Im Rahmen einer Influenzavirusinfektion kommt es zur ISGylierung des NS1-Proteins an Lysin 41 (Zhao 2010), wodurch die Bindung an Importin- $\alpha$  inhibiert wird. (B) Vor allem neusynthetisierte Proteine werden von HERC5, welches an Ribosomen bindet, ISGyliert. ISGylierung viraler Proteine, insbesondere solcher, die an der Kapsidbildung beteiligt sind, könnte einen dominant negativen Effekt auf das Assembly der Proteine haben und damit zu einer verringerten Infektiosität führen (Durfee *et al.* 2010, Abb.: Skaug und Chen 2010).

ISGyliert wird (Tang *et al.* 2010, Zhao *et al.* 2010). Krug und Kollegen (Zhao *et al.* 2010) zeigten, dass die ISGylierung beim NS1-Protein von A/Udorn/72 am Lys 41 erfolgt und postulieren, dass dadurch die Interaktion mit Importin- $\alpha$  und somit die virale Replikation inhibiert wird. Im Gegensatz dazu zeigen Huibregtse und Kollegen, dass HERC5 relativ unspezifisch neusynthetisierte Proteine und damit auch virale Proteine ISGyliert (Durfee *et al.* 2010).

Sie postulieren, dass selbst eine sehr geringe Anzahl ISGylierter viraler Strukturproteine zu Störungen beim Verpacken der Viren und damit zu einer Verringerung der Infektiosität führen könnte. Des Weiteren wird unkonjugiertes ISG15 von Zellen sezerniert und wirkt als Cytokin bei der Modulation der Immunantwort (D'Cunha *et al.* 1996).

### **1.3.2 Interaktion viraler Proteine mit dem Interferonsystem**

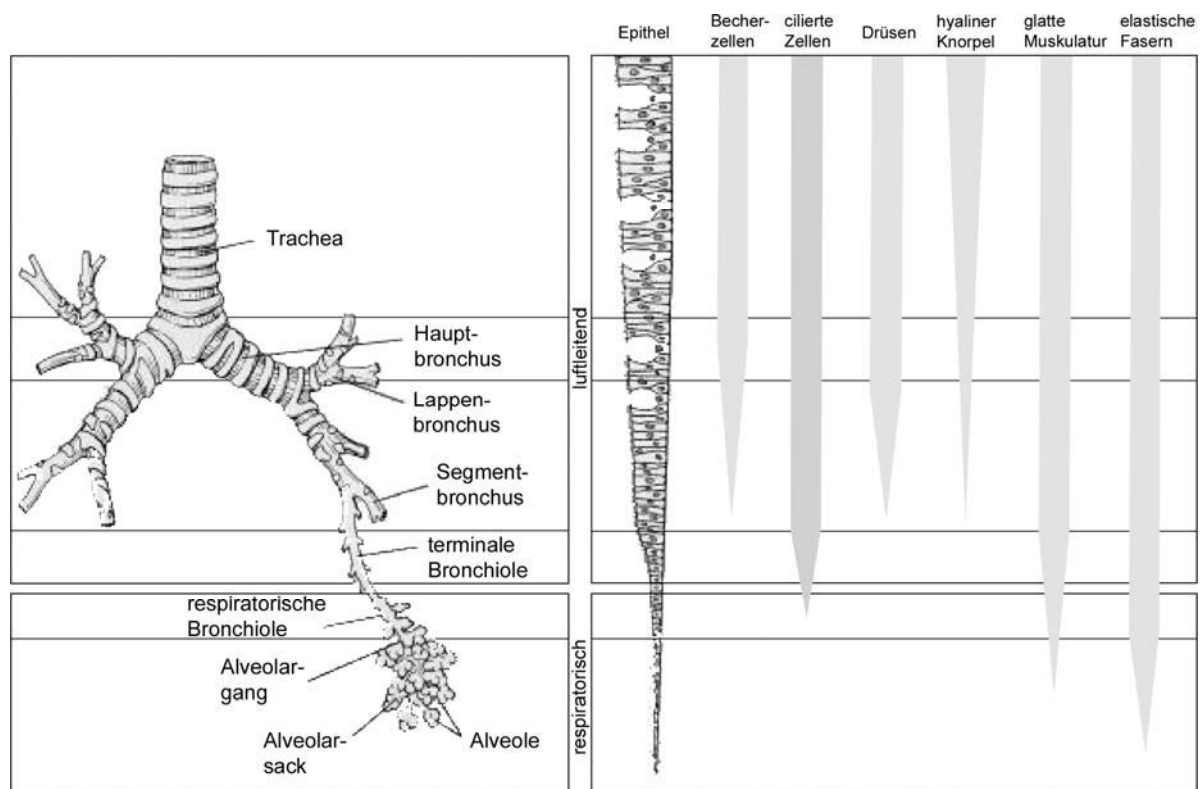
Influenzaviren können die IFN-Antwort blockieren und dadurch ihre Replikationseffizienz steigern. Hierbei spielt vor allem das virale NS1 eine entscheidende Rolle. Es wurde beschrieben, dass NS1 die RIG-I-vermittelte Expression der IFN-Gene inhibieren kann (Guo *et al.* 2007, Mibayashi *et al.* 2007, Opitz *et al.* 2007, Pichlmair *et al.* 2006). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass NS1 an TRIM25 („*tripartite motif protein 25*“) bindet. Durch diese Bindung wird die Ubiquitinierung der RIG-I CARD Domäne und damit die Aktivierung von RIG-I inhibiert (Gack *et al.* 2009, Ludwig und Wolff 2009). Neben seiner Inhibition der IFN- $\beta$  Gentranskription fördert NS1 über die Bindung an CPSF die Akkumulierung der IFN- $\beta$  prä-mRNA Transkripte und inhibiert damit die Translation (Qiu und Krug 1994, Fortes *et al.* 1994, Noah *et al.* 2003). Des Weiteren inhibiert NS1 die Aktivität einiger interferoninduzierter Genprodukte auch direkt. So konnte gezeigt werden, dass NS1 die Autophosphorylierung und Aktivierung der PKR verhindert (Lu *et al.* 1995, Hatada *et al.* 1999) und auch die Aktivierung der OAS moduliert (Min und Krug 2006).

## **1.4 Der humane Respirationstrakt**

Der humane Respirationstrakt bezeichnet alle für die Atmung zuständigen Organe, dabei unterscheidet man zwischen dem oberen und dem unteren Respirationstrakt. Der obere Respirationstrakt zu dem Nase, Nasopharynx und La-

rinx gehören dient der mechanischen Reinigung, Anwärmung und Anfeuchtung der Atemluft. Zu dem unteren Respirationstrakt zählen Trachea, Bronchien und die Lunge, wobei letztere dem eigentlichen Gasaustausch dient. Die Lunge setzt sich aus den Verzweigungen des Bronchialbaumes, den Lungenarterien und -venen und den Alveolen zusammen.

Anatomisch besteht die humane Lunge aus einem linken Lungenflügel mit zwei Lungenlappen und einem rechten Lungenflügel aus drei Lungenlappen.



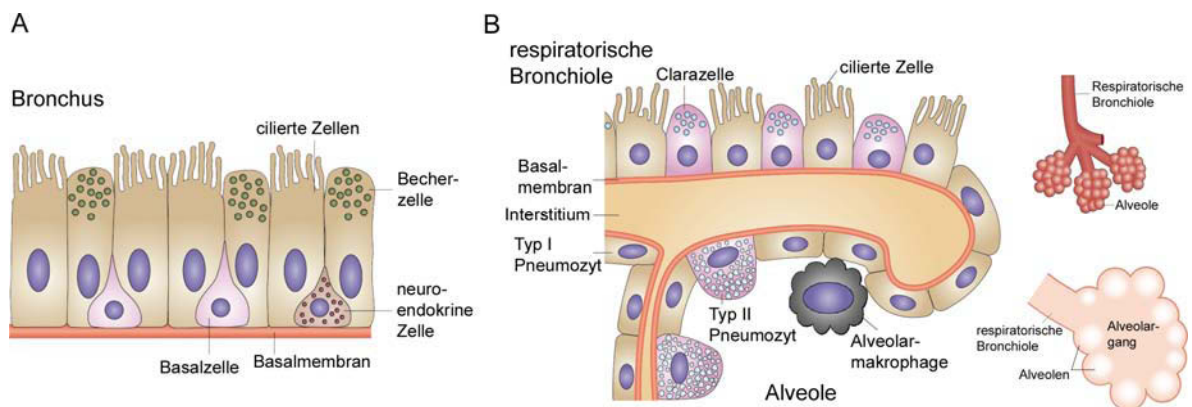
**Abb. 1.11: Einteilung des Bronchialbaumes.** (Bild modifiziert nach Ross und Pawlina 2010)

Die Bronchien verzweigen sich innerhalb der Lungen zunächst in Lappen- und Segmentbronchien, denen die Bronchiolen ( $\varnothing < 1 \text{ mm}$ ), die terminalen Bronchiolen ( $\varnothing \sim 0,4 \text{ mm}$ ) und schließlich die respiratorischen Bronchiolen mit insgesamt geschätzten 300 Millionen Alveolen ( $\varnothing \sim 250 \text{ }\mu\text{m}$ ) folgen (Abb. 1.11 links). Während Lappen- und Segmentbronchien noch durch hyaline Knorpelspannen stabilisiert werden und ihre Wände seromuköse Drüsen enthalten, besitzen Bronchiolen nur noch membranöse Wandungen ohne Drüsen (Abb. 1.11 rechts, Lüllmann-Rauch 2003).

Das Epithel der Bronchien besteht zunächst wie auch im oberen Respirationstrakt aus mehrreihigem hochprismatischem Flimmerepithel mit Becherzellen



(sogenanntem respiratorischen Epithel, Abb. 1.12 A) vereinfacht sich jedoch Richtung Alveolen ständig. So findet sich in den Bronchiolen überwiegend einschichtiges Flimmerepithel mit wenigen Becherzellen, in den terminalen Bronchiolen einfaches zylindrisches bis kubisches Epithel mit Clarazellen ohne Becherzellen (Abb. 1.12 B) und in den Alveolen plattes Alveolarepithel. Das Alveolarepithel besteht aus Pneumozyten Typ I, die mit ihrem dünnen Zellkörpern die Alveolarinnenfläche zu 90% bedecken und die Kapillaren überziehen (Blut-Luft Schranke), und aus Pneumozyten Typ II (Abb. 1.12 B). Letztere sind kubische Zellen, die Surfactant bilden und als Vorläuferzellen für Typ I Pneumozyten dienen.



**Abb. 1.12: Übersicht der Epithelien und verschiedenen Zelltypen in Bronchien (A), respiratorischen Bronchiolen und Alveolen (B).** Während im mehrreihigen Flimmerepithel der Bronchien und im einschichtigen Flimmerepithel der respiratorischen Bronchiolen deutlich cilierte Zellen vorhanden sind, finden sich diese in den Alveolen nicht mehr. Die Alveolen bestehen dagegen vor allem aus Typ I und Typ II Pneumozyten. Zudem finden sich in den Alveolen Alveolarmakrophagen (Bild: modifiziert nach Sun *et al.* 2007).

Während Typ I Pneumozyten arm an Mitochondrien und anderen Organellen sind, ist das Zytoplasma der Typ II Pneumozyten reich an Mitochondrien, rauem und glatten ER und enthält sphärische Körperchen aus lamellenförmigem Lipoproteinmaterial (Lamellarkörperchen (LK)), welche den Surfactant darstellen (Stevens *et al.* 1997). Der sezernierte Surfactant besteht zu 90% aus Phospholipiden, die die Oberflächenspannung des alveolaren Flüssigkeitsfilms vermindern und damit entscheidend zur Atmung beitragen (Lüllmann-Rauch 2003). Die restlichen 10% des Surfactant bestehen aus surfactantassoziierten Proteinen wie SP-A und SP-D welche antimikrobielle und opsonisierende Eigenschaften haben (Sorensen *et al.* 2007). Zudem finden sich in den Alveolen Alveolarmakrophagen, die etwa 10% aller Zellen im Alveolarbereich ausma-

chen und für die Phagozytose von Mikroorganismen, Schwebestäuben und überflüssigem Surfactant verantwortlich sind. Als weitere Immunzellen finden sich im Bindegewebe der Alveolarsepten Leukozyten, Plasmazellen und Mastzellen (Junqueira und Carneiro 2004). Erst kürzlich wurde beschrieben, dass es auch in der Lunge eine große Anzahl von residenten T-Gedächtniszellen gibt, die vorwiegend spezifisch für Antigene sind, die typischerweise im respiratorischen Schleim auftreten. So konnte gezeigt werden, dass in der Lunge auch influenzaantigenspezifische T-Gedächtniszellen vorhanden sein können, die eine schnelle Reaktion auf eine Influenzavirusinfektion ermöglichen (Purwar *et al.* 2011).

### **1.5 Fragestellung der vorliegenden Arbeit**

Influenza-A-Viren lösen beim Menschen jährliche Epidemien und gelegentlich Pandemien aus. Pandemien werden durch Viren verursacht, die ein HA-Protein besitzen gegen das die Bevölkerung keine Immunität besitzt. So trugen die Viren der Pandemien von 1918 (Spanische Grippe), 1957 (Asiatische Grippe) und 1968 (Hong Kong Grippe) HA-Proteine aviären Ursprungs. Die meisten aviären Viren replizieren im Menschen nur ineffizient (Beare und Webster 1991) und nur selten werden direkte Übertragungen vom Vogel auf den Menschen beobachtet. Aufgrund des Beitrages aviärer Viren zur Entstehung einer Pandemie, ist es für ein verbessertes Risikomanagement wichtig die Faktoren bzw. entsprechende Mutationen in diesen Faktoren zu kennen, welche es einem aviären oder porzinen Virus ermöglichen sich in der humanen Population zu etablieren. Ein wesentlicher Unterschied zwischen aviären und humanpathogenen Viren besteht hinsichtlich ihrer Rezeptorpräferenz. Während das aviäre HA präferentiell an SA $\alpha$ -2,3Gal bindet, binden humane HAs an SA $\alpha$ -2,6Gal. Da jedoch gezeigt werden konnte, dass beide Rezeptoren im humanen Respirationstrakt exprimiert sind und zudem H5N1-Viren mit aviären Rezeptorbindungseigenschaften im Menschen replizieren, können Unterschiede in der Rezeptorpräferenz nicht alleinig für die Speziesbarriere verantwortlich sein (Shinya *et al.* 2006, van Riel *et al.* 2006, Matrosovich *et al.* 1999). Des Weiteren konnten u. a. Mutationen in PB2 (627 Glu  $\rightarrow$  Lys) mit einer erhöhten Polymeraseaktivität in Säugerzellen und einer erhöhten Virulenz in Mäusen in

Verbindung gebracht werden (Shinya *et al.* 2004, Hatta *et al.* 2001). Dennoch zeigen auch aviäre H5N1-Viren ohne diese Mutation eine erhöhte Virulenz in Frettchen (Maines *et al.* 2005). Daher lässt sich die Restriktion aviärer Viren nicht nur durch diese Adaptationen in HA und PB2 erklären.

Für bisherige Studien wurden meist Zellkulturen oder Mausmodelle verwendet, die jedoch nur bedingt für Untersuchungen zur Speziesbarriere geeignet sind. So gehören Mäuse nicht zu den natürlichen Wirten der Influenzaviren, exprimieren im Gegensatz zum Menschen hauptsächlich SA $\alpha$ -2,3Gal im Respirationstrakt (Ito *et al.* 1998) und sind für viele humanpathogene Influenzaviren ohne vorhergehende Adaptation nicht empfänglich. Dagegen bestehen Zellkulturen aus genetisch identischen Zellen und geben daher nur sehr begrenzt den humanen Respirationstrakt mit seiner dreidimensionalen Struktur und den verschiedenen Zelltypen wieder. Gerade die komplexen Interaktionen der verschiedenen Zelltypen könnten zum Verlauf einer Influenzavirusinfektion entscheidend beitragen und es wurden bereits Unterschiede im Zelltropismus von aviären und humanen Viren in humanen rekonstituierten Epithelien beschrieben (Matrosovich *et al.* 2004). Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher in Kooperation mit der Charité und dem HELIOS-Klinikum ein humanes Lungenkulturmodell etabliert werden, welches die Untersuchung einer Influenzavirusinfektion in der komplexen Struktur der humanen Lunge mit ihren verschiedenen Zelltypen und Zell-Zell-Interaktionen ermöglicht. Mit Hilfe dieses humanen Lungenmodells sollten weitere Faktoren der Wirtsspezifität und Virulenz durch einen systematischen Vergleich aviärer, porziner und humanpathogener Virusstämme untersucht werden. Dazu sollten auf der einen Seite Merkmale der Virusinfektion (Replikation, Proteinexpression und -lokalisation und Zelltropismus) und auf der anderen Seite die Wirtsantwort auf die virale Infektion (Cytokininduktion, Genexpression) untersucht und diese mit den viralen Merkmalen korreliert werden. Diese Untersuchungen sollten sowohl im Lungenmodell als auch vergleichend dazu in primären Zellen und verschiedenen Zellkultursystemen des humanen Respirationstraktes durchgeführt werden.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

1,5 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
15 ml Röhrchen	Roth, Karlsruhe
50 ml Röhrchen	TPP, Schweiz
Acrylamid (Rotiphorese)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Amphotericin B	Gibco, Karlsruhe
Ampicillin	Roche, Mannheim
Avicel RC-581	FMC BioPolymer, Belgien
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
BEGM SingleQuots®	Lonza, Walkersville, USA
Bleinitrat	Merck, Darmstadt
Borsäure	Roth, Karlsruhe
BPE („bovine pituitary extract“)	Gibco, Karlsruhe
Bruteier (VALO SPF-Eier)	Lohmann, Cuxhaven
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim
Bovines Serum Albumin 30% (BSA)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Bovines Albumin (BA) Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Medium für bronchiale Epithelzellen (BEBM®)	Lonza, Walkersville, USA
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
CL-XPosure™ Film	Thermo Scientific, Rockford, USA
Coomassie Brilliant Blue R250	Roth, Karlsruhe
DEAE-Dextran	Sigma, Steinheim
Dimethylsulfoxid	Sigma, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)	MP, Biomedicals, LLC
Dulbeccos Modified Eagle Medium w/o Met, Cys	MP, Biomedicals, LLC

DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sima-Aldrich, Steinheim
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
EGF („epidermal growth factor“)	Gibco, Karlsruhe
Einwegspritzen	Roth, Karlsruhe
Epon	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethyldinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
FACS-Röhrchen	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Fastprep Lysing Matrix D Caps	MP, Biomedicals, Inc., Frankreich
Formaldehyd 10% (Methanol-frei)	Polysciences, Inc., USA
Formaldehyd 37%	Roth, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Cambridge, GB
Glukose	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Roth, Karlsruhe
Glutaraldehyd	TAAB, Berkshire, UK
Glyzerol	Roth, Karlsruhe
Glyzin	Roth, Karlsruhe
HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) Bio Whittaker	Lonza, Walkersville, USA
HEPES	Roth, Karlsruhe
HiPerfect	Qiagen, Hilden
IFN- $\alpha$ , rekombinant	PBL InterferonSource, Piscataway, USA
IGEPAL CA-830 Fluka	Sigma, Steinheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Keratinozytenmedium	Gibco, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck, Darmstadt
Kristallviolett Fluka	Sigma, Steinheim
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
L-[ $^{35}\text{S}$ ]-Methionin/Cystein	Hartmann, Berlin

Mikrotiterplatten MaxiSorp	Nunc, Roskilde, Dänemark
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Minimal Essential Medium (MEM)	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
Mowiol 4-88	Calbiochem, Bad Soden
Natriumacetat (NaAc)	Roth, Karlsruhe
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdesoxycholat	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Natriumpyruvat für Zellkultur	PAA, Linz, Österreich
Natriumvanadat ( $\text{NaVO}_4$ )	Sigma, Steinheim
Nichtessentielle Aminosäuren, Lösung für die Zellkultur	PAA, Linz, Österreich
Nitrozellulose Transfer-Membran (Protran)	Schleicher & Schuell, Dassel
Opti PRO SFM ohne Glutamin	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
$\text{OsO}_4$	Koch-Light Laboratories Ltd., UK
Parafilm	American National Can, Chicago, USA
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
Pefabloc	Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Invitrogen, Karlsruhe
Pipetten für die Zellkultur	Roth, Karlsruhe
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protein-Assay zur Proteinkonzentrationsbestimmung	BioRad, München
Protein-Molekulargewichtsstandard	Fermentas, St. Leon-Rot
Retinolsäure	Gibco, Karlsruhe
RPMI 1640	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe

RPMI 1640 w/o Met, Cys	MP Biomedicals, LLC
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Saponin Fluka	Sigma-Aldrich, Steinheim
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
SuperSignal WestDura Extended Duration Substrat	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Substrate Solution (A+B)	BD, Franklin Lakes, USA
Tannin	Mallinckrodt, Phillipsburg, USA
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
TNBP (Tri-n-butylphosphat)	Merck, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Roth, Karlsruhe
Triton-X100	Serva, Heidelberg
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA Clonetics®	Lonza, Walkersville, USA
Trypsin (TPCK behandelt)	Sigma, Steinheim
Trypsin Neutralizing Solution (TNS)	Lonza, Walkersville, USA
Trypton	Difco, Heidelberg
Tween-20	Roth, Karlsruhe
Uranylacetat	Merck, Darmstadt
Zellkulturflaschen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkulturflaschen und -schalen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschalen	Greiner, Solingen
Zellschaber	TPP, Trasadingen, Schweiz

### 2.1.2 Verwendete Zellen

A549-Zellen	Humane alveolare Lungenkarzinomepithelzelllinie (ATCC)
BEAS-2B-(B2B-)Zellen	Humane Bronchioepithelzelllinie, SV40 transformiert (ATCC CRL-9609)
Calu-3-Zellen	Humane adenokarzinome Zelllinie (ATCC HTB-55)
Detroit-Zellen	Humane pharyngeale Epithelzelllinie (ATCC CCL-138)
MDCK-Zellen	Epithelzelllinie aus der Niere eines Hundes (ATCC)
NHBE-Zellen	Primäre humane Bronchioepithelzellen (Lonza)
Vero-Zellen	Epithelzelllinie aus der Niere einer Grünen Meerkatze; serumfrei (AVIR GreenHills Biotechnology, Österreich)



### 2.1.3 Humane Lungenkulturen

Humane Lungenkulturen wurden aus tumorfreiem Lungengewebe, das im Rahmen von Operationen am Helios-Klinikum in Berlin entnommen wurde, gewonnen. Von allen Patienten lagen schriftliche Einverständniserklärungen vor und die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité genehmigt. Bei dem Lungengewebe handelte es sich überwiegend um alveoläres Gewebe aus dem unteren Lungenlappen.

### 2.1.4 Verwendete Influenzavirusstämme

Pan/99	- A/Panama/2007/1999 (H3N2)	FG17, RKI, Berlin
PanΔNS1	- A/PanamaΔNS1/2007/1999 (H3N2)	FG17, RKI, Berlin
NC/99	- A/New Caledonia/20/1999 (H1N1)	FG17, RKI, Berlin
Bay/09	- A/Bayern/63/2009 (H1N1 pdm)	FG17, RKI, Berlin
HH/09	- A/Hamburg/4/2009 (H1N1 pdm)	FG17, RKI, Berlin
Thai/04	- A/Thailand/1 (Kan-1)/2004 (H5N1)	FG17, RKI, Berlin
Dk/Alb	- A/duck/Alberta/60/76 (H12N5)	FG17, RKI, Berlin
Sw/Wis	- A/swine/Wisconsin/1/67 (H1N1)	FG17, RKI, Berlin

### 2.1.5 Antikörper

**Tab. 2.1:** Übersicht der verwendeten primären Antikörper.

Primäre Antikörper					
Bezeichnung	Spezies, Eigenschaft	Verdünnung			Hersteller
		WB	IF	FACS	
α-Influenza A/NP	Maus, monoklonal	1:1000	1:1000	1:500	Serotec
α-Influenza A/M	Maus, monoklonal	1:1000	1:50	-	Serotec
α-Influenza A/NS1	Kaninchen, polyklonal	1:3000	1:1000	-	BioGenes
α-Influenza A/NS2	Kaninchen, polyklonal	-	1:500	-	BioGenes
α-β-Aktin	Maus, monoklonal	1:10000	-	-	Sigma
α-ISG15	Kaninchen, polyklonal	1:750	1:1000	1:1000	BioGenes
α-MxA	Maus, monoklonal	-	1:200	-	Flohr <i>et al.</i> 1999
α-HA (H3)	Maus, monoklonal	1:1000	-	-	Abcam
α-HA (H12)	Maus, monoklonal	1:1000	-	-	Immune Technology

**Tab. 2.2:** Übersicht der verwendeten sekundären Antikörper.

Sekundäre Antikörper					
Bezeichnung	Spezies, Eigenschaft	Verdünnung			Hersteller
		WB	IF	FACS	
α-Kaninchen-HRP	Schwein, polyklonal	1:20000	-	-	Dako
α-Maus-HRP	Kaninchen, polyklonal	1:20000	-	-	Dako
α-Kaninchen-Alexa488	Ziege, polyklonal	-	1:1000	1:1000	Invitrogen
α-Maus-Alexa594	Ziege, polyklonal	-	1:1000	-	Invitrogen
α-Maus-Cy5	gekoppelt mit FluoroLink™	-	-	1:500	Amersham
α-Maus-IRDye 600	Ziege, polyklonal	-	1:10000	-	Li-Cor

**Tab. 2.3:** Übersicht der verwendeten Lektine, Farbstoffe und Substrate.

Lektine, Farbstoffe, Substrate				
Bezeichnung	Verdünnung			Hersteller
	WB	IF	FACS	
MAL-PE	-	-	1:25	VectorLabs
SNL-FITC	-	-	1:50	VectorLabs
Isotyp-FITC	-	-	1:50	VectorLabs
PE	-	-	1:100	VectorLabs
DAPI	-	1:20000	-	Roth

## 2.1.6 Kits

IFN-α ELISA	PBL InterferonSource, Piscataway, USA
IFN-β ELISA	FUJIREBIO Inc., Tokyo, Japan
ELISA OptEIA™ (IL-6, IL-8, IL-1β)	BD, Franklin Lakes, USA
Zytokin-Multiplex-ELISA	Panomics, Vignate, Italien
BCA-Proteinassay (Pierce)	Thermo Scientific, Rockford, USA

## 2.1.7 Zell- und Lungenkulturmedien

### 2.1.7.1 Medien für A549-, Detroit- und MDCK-Zellen

<u>Kulturmedium</u>	DMEM bzw. MEM
	FKS 10%
	Glutamin 2 mM
	Pen/Strep 100 µg(U)/ml

### Infektionsmedium

DMEM bzw. MEM

BSA	0,2%
Glutamin	2 mM
Pen/Strep	100 µg(U)/ml

### Avicel-Overlay

2,5% Avicel RC-581 Pulver in H<sub>2</sub>O bidest 1 h bei RT auf Magnetrührer lösen und autoklavieren (121°C, 20 min)

1:1 mit 2x MEM mischen

BSA	0,2%
NaHCO <sub>3</sub>	0,05%
Dextran	0,05%
TPCK-Trypsin	1 µg/ml

### Oxoidagar-Overlay

für 36 ml:

2x MEM	17 ml
H <sub>2</sub> O	8 ml
BSA	0,2%
NaHCO <sub>3</sub>	0,05%
Dextran	0,05%
2% Oxoidagar	10 ml
TPCK-Trypsin	1 µg/ml

## 2.1.7.2 Medien für B2B-Zellen

### Coatinglösung

Fibronektin	50 ng/ml
Vitronektin	50 ng/ml
BSA	0,01%

### Kulturmedium = Infektionsmedium

Keratinozytenmedium	500 ml
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	0,1 µg/ml
Glutamin	2 mM
Epinephrin	0,5 µg/ml
EGF	5 ng/ml
BPE	5 µg/ml
Retinolsäure (1 mg/ml)	50 µl
Amphotericin B	5 µg/ml

### 2.1.7.3 Medien für Calu-3-Zellen

<u>Kulturmedium</u>	MEM	
	FKS	15%
	Glutamin	2 mM
	Nichtessentielle AS	0,1 mM
	Na-Pyruvat	1 mM
	Pen/Strep	100 µg(U)/ml

<u>Infektionsmedium</u>	MEM	
	BSA	0,3%
	Glutamin	2 mM
	Nichtessentielle AS	0,1 mM
	Na-Pyruvat	1 mM
	Pen/Strep	100 µg(U)/ml

### 2.1.7.4 Medien für Vero-Zellen

<u>Kulturmedium</u> = <u>Infektionsmedium</u>	OptiPro SFM	
	Glutamin	4 mM
	Pen/Strep	100 µg(U)/ml

### 2.1.7.5 Medien für NHBE-Zellen

<u>Kulturmedium</u> = <u>Infektionsmedium</u>	BEBM®+ BEGM SingleQuots (BPE, Hydrocortison, hEGF, Epinephrin, Insulin, Triiodothyronin, Transferrin, Gentamycin/ Amphotericin B, Retinolsäure)
---	---

### 2.1.7.6 Medien für humane Lungenkulturen

<u>Kulturmedium</u> = <u>Infektionsmedium</u>	RPMI	
	BSA	0,3%
	Glutamin	2 mM
	Pen/Strep	100 µg(U)/ml

### 2.1.8 Puffer und Lösungen

<b>PBS</b>	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	80,9 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
<b>PBS<sup>++</sup></b>	PBS	
	BSA	0,2%
	MgCl <sub>2</sub>	0,1 g/l
	CaCl <sub>2</sub>	0,13 g/l
<b>FACS-Puffer</b>	PBS	
	BSA	0,5%
	NaN <sub>3</sub> , pH 7,4	0,02%
<b>Saponinpuffer</b>	FACS-Puffer	
	Saponin	0,33%, filtriert
<b>Kristalviolettlösung</b>		
1:10 mit 4% Formaldehyd/PBS verdünnte 10x Stocklösung aus		
	Ethanol	20% (v/v)
	Kristalviolett	1% (w/v)
<b>Zelllysispuffer</b>	Tris, pH 7,5	50 mM
	NaCl	150 mM
	IGEPAL	1% (v/v)
	EDTA	1 mM
	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	1 mM
	Pefabloc	1 mM
<b>10x SDS-Elektrophoresepuffer</b>	Tris	250 mM
	Glycin	1,92 M
	SDS	10 g/l
<b>6x SDS-Probenpuffer</b>	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	9,8 ml
	1 M Tris-HCl, pH 7,5	1,2 ml
	1 M HCl	0,4 ml
	SDS	1,7 g

	0,5 M EDTA	0,5 ml
	Glyzerin	5 ml
	Bromphenolblau	Spatelspitze
	$\beta$ -Mercaptoethanol	8% (v/v)

**2x SDS-Probenpuffer**

H <sub>2</sub> O	1,2 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	8,3 ml
10% SDS (w/v)	6 ml
Glycerin	1,5 ml
Bromphenolblau	9 mg/ml
$\beta$ -Mercaptoethanol	5%

**Fixierlösung**

Ethanol	30%
Essigsäure	10%

**Semidry-Blotpuffer**

Tris	48 mM
Glyzin	30 mM
SDS	1,3 mM
Methanol	20% (v/v)

**10x TBST**

Tris-HCl, pH 8,0	100 mM
NaCl	1,5 M
Tween 20	0,5% (v/v)

**Mowiol**

Mowiol 4-88	2,4 g
Glycerol	6 ml
dH <sub>2</sub> O	6 ml

- über Nacht quellen lassen, dann 12 ml 0,2 M Tris pH 8,5 hinzufügen
- rührend auf 50-60°C erhitzen; 15 min bei 4000 rpm zentrifugieren
- zum Überstand 10% (w/v) DABCO; Aliquots bei -20°C lagern

**Coatingpuffer (0,1 M Natriumcarbonat)**

NaHCO <sub>3</sub>	7,13 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,59 g

Ad 1 l H<sub>2</sub>O, pH 9,5 mit 10 N NaOH einstellen

**Assayverdünnungspuffer**

PBS mit 10% FKS

**Waschpuffer**

PBS mit 0,05% Tween 20

### 2.1.9 Geräte

LSM 510	Zeiss, Jena
Elektrophoresezubehör	BioRad, München
Eppendorf Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
FACS-Calibur	BD, Franklin Lakes, USA
FastPrep®-24 (Homogenisator)	MP Biomedicals, Inc., Frankreich
Immunfluoreszenz-Mikroskop Diaphot 300	Nikon, Düsseldorf
Laminar Airflow HERAsafe	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Luminex100	BioRad, München
MS2 Minishaker	IKA, Staufen
Nikon Eclipse TS100	Nikon, Düsseldorf
Odyssey-Scanner	LI-COR biosciences, Nebraska, USA
Phero-Temp 40 (Geltrockner)	BioTec-Fischer
Power Pac 200 und 300	BioRad, München
<i>"slow-scan charge-coupled-device camera"</i>	Pro Scan, Lagerlechfeld
SPOT RT Digitalkamera	Diagnostic Instruments, S.H., USA
TECAN GENios Pro	TECAN, Crailsheim
TEM 902 (Transmissionselektronenmikroskop)	Carls Zeiss SMT AG, Jena
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, München
Transilluminator	INTAS, Göttingen
Ultracut S	Leica, Wetzlar
Ultrazentrifuge TL-100 mit Rotor TLA-55	Beckman, Krefeld
Zellkulturschrank	Sanyo/EWALD, Bad Nenndorf
Zellkulturschrank NuAIRE	Varolab, Gießen
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Multifuge 1SR	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Zentrifuge Pico 17	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Zentrifuge RC5C mit den Rotoren SS-34 u. GSA	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe

### 2.1.10 Software

Adobe Photoshop CS3 extended	Bildbearbeitung
Adobe Acrobat Professional 9	Textverarbeitung
AIDA Image Analyzer v.4.18	Bildbearbeitung
Bioplex Manager 4.0	Multiplexmessung und Auswertung
CellQuest	FACS-Messung
Endnote X4	Referenzverwaltung

FlowJo 8.8.4	FACS-Auswertung
GraphPad Prism 5	Tabellenkalkulation, Statistik
Lasergene 8	Sequenzauswertung
LSM Image Browser 3.5	cLSM Messung und Auswertung
Magellan	ELISA-Messung
Microsoft Office 2003	Tabellenkalkulation, Textverarbeitung

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zell- und Lungenkultur

Alle Zell- und Lungenkulturarbeiten fanden unter sterilen Bedingungen statt. Vor der Verwendung wurden alle Medien und Zusätze auf 37°C vorgewärmt. Die Zell- und Lungenkulturen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### 2.2.1.1 Kultur permanenter Zelllinien

Die Kultivierung der A549- und Detroit-Zellen erfolgte in Kultur-DMEM. MDCK- und Calu-3-Zellen wurden in Kultur-MEM, Vero-Zellen in OptiPro-Medium und B2B-Zellen in Keratinozytenmedium kultiviert. Die Zusammensetzung der einzelnen Medien ist im Abschnitt 2.1.6 beschrieben.

Alle Zellen wurden in T75 Zellkulturflaschen mit 13 ml Medium kultiviert und umgesetzt sobald sie ~ 95% konfluent waren. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und mit Hilfe von 1 ml Trypsin (2 ml für MDCK-Zellen) bei 37°C abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in 10 ml Medium aufgenommen und entsprechend umgesetzt. Für die B2B-Zellen wurden die neuen Flaschen vor dem Umsetzen für 30 min bei RT mit Coatinglösung inkubiert um ein besseres Anheften der Zellen am Boden zu ermöglichen.

#### 2.2.1.2 Kultur primärer NHBE-Zellen

Für alle Versuche wurden nur NHBE-Zellen der 2. Passage verwendet. Zellen der Passage 1 wurden aufgetaut und in einer T75 Zellkulturflasche mit 13 ml BEGM inkubiert. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage erneuert und die



Zellen für etwa sieben bis neun Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen laut Herstellerangaben abtrypsiniert, abzentrifugiert und direkt in 12-well Platten ausgesät (40.000 pro well) und für weitere 10 bis 12 Tage bis zur völligen Konfluenz kultiviert. Dabei wurde das Medium alle zwei bis drei Tage erneuert.

### 2.2.1.3 Präparation und Kultur des Lungengewebes

Das humane Lungengewebe wurde in RPMI-Medium auf Eis direkt vom Operationssaal zu unseren Kooperationspartnern an der Charité transportiert und im Anschluss direkt präpariert. Das Gewebe wurde zunächst mit einem Skalpell in etwa 3 mm dicke Scheiben geschnitten und anschließend mit Hilfe einer 8 mm Biopsiestanze in kleine Stücke ( $\sim 3 \times 8 \times 8$ ,  $\sim 100$  mg) geschnitten. Die Gewebestücke wurden gewaschen und in 24-well Platten mit 1,5 ml RPMI-Medium ÜN inkubiert.

## 2.2.2 Arbeiten mit Influenzaviren

### 2.2.2.1 Infektion humaner Zellen und Lungenkulturen

Alle Experimente mit H5N1-Viren wurden unter L3-Laborbedingungen durchgeführt. Für die Infektion wurden 80 – 95% konfluente Zellen verwendet. Diese wurden zunächst zweimal mit PBS gewaschen, dann mit der Virusverdünnung für 45 min bei RT inkubiert und alle 10 min geschwenkt. Die Virusverdünnungen erfolgten in PBS<sup>++</sup> (150 µl im 12-well), wobei die eingesetzte Menge infektiöser Partikel pro Zelle als Multiplizität der Infektion (moi) angegeben wurde. Das einzusetzende Virusvolumen ergibt sich für eine moi von x wie folgt:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{Virustiter [pfu/ml]}} \cdot x \cdot 1000 = \text{Volumen Virusstock [\mu l]}$$

Nach der 45-minütigen Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in Infektionsmedium kultiviert. Da die HA-Proteine mit monobasischer Spaltstelle von speziellen Proteasen gespalten werden können, die von den meisten Zelllinien nicht exprimiert werden, wurde dem Infektionsmedium wie folgt TPCK-Trypsin zugesetzt:

**Tab. 2.4:** Verwendete Mengen TPCK-Trypsin im Infektionsmedium.

Zellen	MDCK	Vero	Detroit	Calu-3	B2B	A549	NHBE	Lungenmodell
Trypsin [ $\mu\text{g/ml}$ ]	1	0,5	0,2	0	1	0,2	0	0

Für die Analyse der Virusvermehrung wurde zu den entsprechenden Zeitpunkten maximal 10% des Überstandes abgenommen und durch frisches Infektionsmedium ersetzt. Alle Überstände wurden durch Zentrifugation bei 2500 rpm für 5 min von möglichem Zelldebris befreit und anschließend der Überstand sofort verarbeitet oder bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Infektion der primären NHBE-Zellen erfolgte analog zu den Zellkulturen mit den Ausnahmen, dass die Virusverdünnung in BEGM und die Inkubation mit der Viruslösung bei  $37^{\circ}\text{C}$  erfolgten.

Für die Infektion der Lungenkulturen wurden diese zunächst dreimal mit PBS gewaschen und dann für 1 h bei RT soweit nicht anders angegeben mit  $4 \times 10^5$  pfu der Viren (verdünnt in RPMI-Medium, Gesamtvolumen 500  $\mu\text{l}$ ) auf einem Schwenker inkubiert. Die Lungenstücke wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen und in 1,5 ml RPMI-Medium bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank inkubiert.

#### 2.2.2.2 Virusanzucht im Hühnerei, auf Vero- und MDCK-Zellen

Die Virusanzucht des aviären (Dk/Alb) und des porzinen (Sw/Wis) Virus erfolgte im embryonierten Hühnerei, die Viren Pan/99 sowie Pan $\Delta$ NS1 wurden auf Vero-Zellen, Thai/04, NC/99 sowie die pandemischen H1N1-Viren auf MDCK-Zellen angezogen.

Für die Herstellung der Virusstocks in embryonierten Hühnereiern wurden die Eier desinfiziert und anschließend mit Hilfe einer braunen Kanüle 1000 bis 2000 pfu in PBS<sup>++</sup> (in 100  $\mu\text{l}$ ) in die Allantoishöhle injiziert. Das Einstichloch wurde mit Ponal Holzkleber verschlossen und die Eier bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank inkubiert. Nach zwei Tagen wurden die Eier ÜN zu  $4^{\circ}\text{C}$  gestellt, am nächsten Tag die Eierschale über der Allantoishöhle vorsichtig entfernt und die virusenthaltende Allantoisflüssigkeit mit Hilfe einer 10 ml Pipette abgenommen. Allantoisflüssigkeiten die eine hohe Anzahl von Viruspartikeln enthielten wurden zentrifugiert, vereint und aliquotiert bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Für die Herstellung der Virusstocks in Zellkulturen wurden in T75 Flaschen ausgesäte Zellen mit einer  $\text{moi}$  von 0.001 infiziert (s. 2.2.2.1). Zellkulturüberstände wurden nach 48 h abgenommen, zentrifugiert und aliquotiert bei  $-80^{\circ}\text{C}$  weggefroren.

### 2.2.2.3 Virustiterbestimmung mittels Plaquetest

Mit Hilfe des Plaquetestes ist es möglich, die Anzahl infektiöser Influenzaviruspartikel in einer Viruslösung zu bestimmen. Der hierbei bestimmte Titer wird als plaquebildende Einheit („*plaque forming unit*“ (pfu)) angegeben.

Für die Plaquetests wurden in 12-well Platten ausgesäte MDCK-Zellen mit Verdünnungsreihen (1:10, z. B. von  $10^{-1}$  bis  $10^{-6}$ ) der zu untersuchenden Viruslösung infiziert (s. 2.2.2.1) und anschließend mit Avicelmedium (s. 2.2.2.3.1) oder Oxoidagar (s. 2.2.2.3.2) inkubiert.

#### 2.2.2.3.1 Plaquetest mittels Avicelmedium

Nach der Infektion wurden die Zellen mit Avicelmedium (Zusammensetzung s. 2.1.6) überschichtet. Die Avicelpartikel setzten sich auf den infizierten Zellen ab und verhindern die freie Diffusion neugebildeter Viruspartikel, so dass diese jeweils nur die anliegenden Zellen infizieren können und es bei ausreichender Verdünnung der Viruslösung zur Bildung einzelner Plaques kommt. Zur Bestimmung der plaquebildenden Einheiten (pfu) wurde das Avicelmedium 48 h nach der Infektion abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und die Plaques mit einer 0,1% Kristallviolett/ 10% Formaldehydlösung fixiert und visualisiert. Alternativ wurden für manche Experimente auch plaquebildende Einheiten per Immunfluoreszenzanalyse bestimmt. Hierfür wurden die infizierten Zellen bereits 24 h nach der Infektion gewaschen, 20 min fixiert (4% Formaldehyd/PBS), 15 min permeabilisiert (0,25% Triton-X-100/PBS) und anschließend über eine NP-Immunfärbung sichtbar gemacht.

#### 2.2.2.3.2 Plaquetest mittels Oxoidagar

Für die Bestimmung der Virustiter der pandemischen H1N1-Viren wurden die Platten nach der Infektion mit Oxoidagar überschichtet. Dafür wurde der Oxoidagar kurz in der Mikrowelle aufgekocht, anschließend bei  $56^{\circ}\text{C}$  inkubiert

und erst kurz vor Gebrauch mit den restlichen Bestandteilen (s. 2.1.7.1) bei 37°C vermischt und auf die Zellen gegeben. Nach dem Erhärten des Agars wurden die Zellen über Kopf für 48 h inkubiert, anschließend ÜN mit einer 0,1% Kristallviolett/10% Formaldehydlösung bei RT fixiert und die Plaques sichtbar gemacht.

### 2.2.2.4 Hämagglutinationstest (HA-Test)

Mit Hilfe des HA-Testes können Viruskonzentrationen abgeschätzt und Rezeptorbindungseigenschaften verschiedener Influenzaviren untersucht werden. Die von Hirst bereits 1941 publizierte Methode (Hirst 1941) basiert auf der Tatsache, dass das virale Oberflächenprotein HA an endständige Neuraminsäuren auf (Hühner)erythrozyten binden und diese Quervernetzen (Agglutinieren) kann. Mit diesem Test kann jedoch nicht zwischen infektiösen und nicht-infektiösen Partikeln unterschieden werden, da er allein das Vorhandensein von HA-Proteinen anzeigt.

Für den HA-Test wurden je 100 µl Viruslösung in die erste Vertiefung einer 96-well Platte und ab der 2. Vertiefung 50 µl PBS vorgelegt. Anschließend wurden jeweils 50 µl zur Herstellung einer 1:2 Verdünnung pipettiert. Zu jeder Virusverdünnung wurden 50 µl einer 1%igen Hühnererythrozytenlösung pipettiert, gut vermischt und bei 4°C für 30 min inkubiert. Sind genug Viren vorhanden, kommt es zur Agglutination der Erythrozyten. Sind bei höheren Verdünnungen nicht mehr ausreichend Viren vorhanden, sinken die Erythrozyten zu Boden und werden als roter Punkt in der Vertiefung sichtbar. Der HA-Titer wird als HA-Unit (HAU) angegeben und entspricht dem reziproken Wert der Verdünnungsstufe bei der es noch zur Agglutination kommt. Um die Anzahl der Viruspartikel über die gemessenen HAU abzuschätzen, wurde folgende von Marcus *et al.* postulierte Umrechnung von HAU zu sogenannten hämagglutinierenden Partikeln (HAP) benutzt (Marcus *et al.* 2009):

$$\text{HAU/ml} \cdot 5 \times 10^6 = \text{HAP/ml}$$

Für die Untersuchung der Rezeptorbindung verschiedener Influenzaviren werden Erythrozyten von Huhn, Pute und Pferd verwendet. Während Hühner- und Putenerythrozyten sowohl SAα-2,3Gal als auch SAα-2,6Gal auf ihrer Oberflä-

che tragen, besitzen Pferdeerythrozyten fast ausschließlich SA $\alpha$ -2,3Gal. Damit können nur Viren, die aviäre Rezeptoren binden können, letztere agglutinieren. Die HA-Tests mit Puten- und Pferdeerythrozyten wurden analog zu den beschriebenen Tests mit Hühnererythrozyten durchgeführt. Die verwendete Putenblutlösung war 0,5%ig.

### 2.2.2.5 Plaquereinigen der Virusstämme

Da natürliche Influenzavirusisolate häufig aus einer Mischpopulation bestehen, wurden die Virusisolate A/duck/Alberta/60/76 und A/swine/Wisconsin/1/67 zunächst plaquegereinigt, um eine einheitliche Viruspopulation zu gewährleisten.

Dafür wurden MDCK-Zellen mit verschiedenen Verdünnungen der Virusstocks infiziert und anschließend mit Oxoidagar inkubiert (s. 2.2.2.1, 2.2.2.3.2). Sobald deutliche einzelne Plaques sichtbar waren (nach 2-3 Tagen) wurden diese mit Hilfe einer abgeschnittenen 100  $\mu$ l-Spitze gepickt. Die gepickten Agarstückchen wurden ÜN in PBS<sup>++</sup> inkubiert und gelöst. Anschließend wurde davon eine 1:100 Verdünnung für die Infektion von embryonierten Hühnereiern verwendet (s. 2.2.2.2).

## 2.2.3 Zellbiologische Methoden

### 2.2.3.1 FACS („*Fluorescence activated cell sorting*“)-Analyse

Der Nachweis SA $\alpha$ -2,3Gal bzw. SA $\alpha$ -2,6Gal auf den Zelloberflächen sowie die Quantifizierung von ISG-15 erfolgte mittels direkter bzw. indirekter FACS-Analyse. Hierfür wurden die Zellen zunächst abtrypsiniert, in FACS-Röhrchen überführt und zum Waschen bei 1000 rpm (5 min, 4°C) pelletiert, in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen und nochmals pelletiert. Zum Nachweis SA $\alpha$ -2,3Gal bzw. SA $\alpha$ -2,6Gal wurden die Zellen anschließend bei 4°C für 30 min mit biotinylierten *Maackia amurensis* (MAL) oder FITC-konjugiertem *Sambucus nigra* Lektin (SNL) inkubiert. MAL wird aus Samen des Asiatischen Gelbholzes (*Maackia amurensis*) isoliert und bindet hauptsächlich an SA $\alpha$ -2,3Gal, während SNL, welches aus der inneren Rinde des schwarzen Holunders (*Sambucus nigra*) gewonnen wird, an SA $\alpha$ -2,6Gal bindet. Nach der Inkubation wur-

den die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen, die biotinylierten Proben mit PE-gekoppelten Streptavidin für 30 min bei 4°C inkubiert und FL1 und FL2 in einem FACS Calibur gemessen. Als Kontrolle dienten Zellen, die analog mit entsprechenden Isotypkontrollen inkubiert wurden.

Zur Quantifizierung der intrazellulären Proteine ISG15 und NP wurden die Zellen zunächst mit 4% PFA ÜN auf Eis fixiert, gewaschen und anschließend für 10 min mit 1 ml Saponinpuffer permeabilisiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte in Saponinpuffer für 30 min bei RT. Nach einem Waschschrift mit 1 ml Saponinpuffer wurden die Zellen mit fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörpern weitere 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss einmal mit 1 ml Saponinpuffer und einmal mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und die Floreszenzintensitäten im FACS Calibur bestimmt. Die verwendeten Lektine und Antikörper und deren Verdünnungen sind in Tab. 2.1, Tab. 2.2 und Tab. 2.3 angegeben.

### 2.2.3.2 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse

Der Nachweis und die Lokalisation viraler und zellulärer Proteine in infizierten Zellen erfolgten mittels der indirekten Immunfluoreszenz. Die auf Deckgläschen ausgesäten und infizierten Zellen wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten mit 2,5%iger Formaldehydlösung für 20 min fixiert, für 10 min mit 0,2%iger Triton-X-100-Lösung permeabilisiert und anschließend für 1 h mit 3% BSA geblockt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte für 1 h bei RT in 3% BSA, gefolgt von drei Waschschriften mit PBS und einer 45-minütigen Inkubation mit den entsprechenden fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörpern bei RT im Dunkeln. Für die Anfärbung des Zellkerns wurden einige Proben zusätzlich mit DAPI inkubiert, welches zu der sekundären Antikörperlösung pipettiert wurde. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, kurz in H<sub>2</sub>O getaucht und mit Mowiol (7 µl) eingedeckelt. Die Visualisierung der markierten viralen bzw. zellulären Proteine erfolgte mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (cLSM). Die verwendeten Antikörper und deren Verdünnungen sind in Tab. 2.1 und Tab. 2.2 angegeben.

### 2.2.3.3 Elektronenmikroskopie

Für die Darstellung der Viren in A549-Zellen wurden diese mit einer  $moi$  von 5 infiziert, nach 24 h der Überstand vorsichtig abgenommen und die Zellen für 1 h bei RT in 4% Paraformaldehyd/ 0,05% Glutaraldehyd in HEPES 0,05 M fixiert. Die fixierten Proben wurden in 4% Paraformaldehyd in HEPES 0,05 M bei 4°C gelagert und anschließend von Gudrun Holland (ZBS4) für die elektronenmikroskopische Analyse aufbereitet. Die Proben wurden über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und in Lowicryl (HM20) eingebettet. Dafür wurde die sogenannte PLT-Technik („*progressive lowering temperature*“) angewendet, d. h. die Proben wurden in 30% Ethanol (0,5% Uranylacetat) auf Eis, in 50% und 70% Ethanol bei -20°C und ab 95% Ethanol bei -35°C inkubiert. Die Infiltration der Proben mit Gemischen aus Alkohol und Kunststoff sowie mit reinem flüssigem Kunststoff erfolgte bei -35°C. Anschließend wurde der Kunststoff mittels UV-Behandlung bei -35°C polymerisiert, Ultradünnschnitte ( $\sim 70$  nm) mit Hilfe eines Ultracut-S hergestellt und diese auf unbelagte Nickelgrids (400 mesh) gezogen.

Für die Darstellung der Viren in Lungenkulturen ( $\sim 3 \times 3 \times 3$  mm) wurden diese mit  $1,5 \times 10^7$  bzw.  $3,8 \times 10^6$  pfu (Pan/99 bzw. Dk/Alb) infiziert, nach 24 h der Überstand vorsichtig abgenommen, die Kulturen sofort in 2,5% Glutaraldehyd in HEPES-Puffer unter Schwenken 1 h bei RT fixiert, anschließend bei 4°C gelagert und ebenfalls durch Gudrun Holland (ZBS4) für die elektronenmikroskopische Analyse aufbereitet. Die Proben wurden mit 1%  $OsO_4$  in  $d_4H_2O$  für 1 h nachfixiert, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation in 0,1% Tannin in HEPES 0,05 M und einer weiteren zweistündigen Inkubation in 2% Uranylacetat in  $d_4H_2O$ . Die Proben wurden in einer seriellen Ethanolreihe dehydriert und in Epon eingebettet, welches im Anschluss bei 60°C für 48 h polymerisiert wurde. Dünnschnitte wurden mit Hilfe eines Ultramikrotoms hergestellt und auf spezielle Grids gezogen.

Alle Schnitte wurden mit 2% Uranylacetat für 20 min und mit Bleiacetat für 3 min gegengefärbt (Reynolds 1963). Die Schnitte wurden mit einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM 902) begutachtet und mit Hilfe einer Pro Scan Digitalkamera digitalisiert.

## **2.2.4 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.2.4.1 Herstellung von Zelllysaten**

Zur Herstellung von Lysaten wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS (4°C) gewaschen und anschließend mit Lysispuffer 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgekratzt, in ein Eppendorfgefäß überführt und nochmals 20 min bei 4°C inkubiert. Die Zelllysate wurden für 10 min bei 12.000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit 6x SDS-Probenpuffer versetzt und bei 4°C (bis 1 Woche) bzw. bei -20°C ( $\infty$ ) gelagert.

### **2.2.4.2 Herstellung von Lysaten aus Lungenkulturen**

Zur Herstellung von Lysaten aus Lungenkulturen wurden zu den bei -80°C gefrorenen Lungenstückchen Lysispuffer (500  $\mu$ l/100 mg Gewebe) gegeben. Die Lungenstücke in Lysispuffer wurden in FastprepD-Tubes gefüllt und mit Hilfe eines Fastprep24 aufgeschlossen (3 x 60 s; 5 m/s). Nach dem Aufschluss wurden die Röhrchen für 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in einem neuen Eppendorfgefäß nochmals bei 12.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der geklärte Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration mittels BCA-Proteinassay nach Herstellerangaben bestimmt. Anschließend wurde der Überstand mit 6x SDS-Probenpuffer versetzt und bei -20°C gelagert.

### **2.2.4.3 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Mit Hilfe der denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine anhand ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden (Lämmli 1970).

Die Herstellung der Gele erfolgte mit Hilfe einer Mini-Protean3-Gießvorrichtung (Biorad). Zunächst wurde das Trenngel (Zusammensetzung s. Tab. 2.5) zwischen zwei ethanolgereinigte Glasplatten (Abstand 0,75 oder 1,5 mm) und nach dessen Polymerisation das Sammelgel gegossen. Die Taschen zur Probenbeladung wurden durch einen ins Sammelgel eingesetzten Kamm erzeugt. Die mit SDS-Probenpuffer versetzten Proben wurden 5 min bei 95°C aufgeköcht und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei



25 mA pro Gel in einer vertikalen Laufapparatur, die mit 1x SDS-Elektrophoresepuffer gefüllt war.

**Tab. 2.5:** Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele.

Zusammensetzung der SDS-Gele	Trenngel			Sammelgel
	8%	12,5%	13%	5%
30% Acrylamid/Bis (29:1)	2,7 ml	4,1 ml	4,3 ml	0,83 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	-	-	-	1,25 ml
H <sub>2</sub> O	4,6 ml	3,2 ml	3,0 ml	2,8 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	100 µl	50 µl
10% APS	100 µl	100 µl	100 µl	50 µl
TEMED	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl

#### 2.2.4.4 Fixieren und Trocknen von SDS-Gelen

Zur Detektion radioaktivmarkierter Proteine mittels Autoradiographie wurden die Gele zunächst fixiert und getrocknet. Die Fixierung erfolgte für 1 h bei RT in Fixierlösung. Im Anschluss wurde das Gel auf ein feuchtes Whatman-Papier gelegt, mit Folie abgedeckt und auf dem Phero-Temp 40 Gelrockner bei 75°C unter Vakuum 45 min getrocknet.

#### 2.2.4.5 Westernblotanalyse

Die per SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels „*semidry*“-Blotverfahren auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dazu wurden drei Whatman-Papiere und die Nitrozellulosemembran in „*semidry*“-Blotpuffer äquilibriert und in die Blotapparatatur gelegt. Das ebenfalls kurz in „*semidry*“-Blotpuffer geschwenkte Gel wurde auf die Membran gelegt und anschließend mit wiederum drei „*semidry*“-Blotpuffer befeuchteten Whatman-Papieren überschichtet. Die Proteine wurden bei 80 mA pro Gel für 55 min (dünne 0,75 mm Gele) oder 80 min (dicke 1,5 mm Gele) auf die Membran transferiert. Die Membran wurde nach dem Blotten in 3% fettfreiem Magermilchpulver in TBST geschwenkt, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in 0,5% Magermilchpulver/TBST (oder alternativ in 5% BSA/TBST) für 1-2 h bei RT oder ÜN bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit TBST folgte die Inkubation mit dem entsprechenden

HRP-gekoppelten Sekundärantikörper in 0,5% Magermilchpulver/TBST für 1 h bei RT. Der Blot wurde anschließend gut mit TBST gewaschen und für 5 min mit dem HRP-Substrat inkubiert. Das erzeugte Chemolumineszenzsignal wurde mit Hilfe eines Röntgenfilmes detektiert. Die verwendeten Antikörper und deren Verdünnungen sind in Tab. 2.1 und Tab. 2.2 angegeben.

### 2.2.4.6 „Pulse labeling“ Experimente

Um die in einer Zelle synthetisierten Proteine zu quantifizieren, wurden „pulse labeling“ Experimente durchgeführt. Dazu wurden A549-Zellen mit einer *moi* von 5 infiziert und für 6 bzw. 8 h bei 37°C inkubiert. 1 h vor dem Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen mit Methionin- und Cystein-freiem Medium versetzt. Nach Ende der Inkubationszeit wurden dem Medium S<sup>35</sup>-markierte Methionin/Cystein (30 µCi / well) zugesetzt und die Zellen für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und lysiert (s. 2.2.4.1). Die mit SDS-Probenpuffer versetzten Lysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.2.4.3), die Gele fixiert, getrocknet (s. 2.2.4.4) und mittels Autoradiographie visualisiert.

### 2.2.4.7 „Pulse chase“ Experimente

Um virale Proteine in Viruspartikeln im Kulturüberstand nachzuweisen und zu quantifizieren wurden „pulse chase“ Experimente durchgeführt.

Dafür wurden A549-Zellen bzw. Lungenkulturen mit einer großen Menge Virus infiziert (*moi* 5 bzw. 5x10<sup>6</sup> pfu). Bei den infizierten A549-Zellen wurde 2,5 h p. i. das Medium durch reduziertes Medium ohne Methionin und Cystein ersetzt und die Zellen für eine weitere Stunde inkubiert bevor pro well 30 µCi S<sup>35</sup>-markiertes Methionin/Cystein zugesetzt wurden. Nach weiteren 4,5 h wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, ÜN in Infektionsmedium inkubiert und 24 h p. i. der virushaltige Überstand abgenommen und zentrifugiert (2500 rpm, 10 min). Der Überstand wurde anschließend bei 40.000 rpm für 90 min ultrazentrifugiert (TL-100, Rotor TLA-55, Beckman) um die Viren zu pelletieren. Das Viruspellet wurde in 20 µl 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele wurden fixiert, getrocknet und mittels Autoradiographie visualisiert.

Bei den infizierten Lungenstücken wurde analog zu den A549-Zellen verfahren, lediglich die Zeiten wurden wie folgt geändert: Das Medium wurde bereits 1 h nach der Infektion auf Methionin- und Cystein-freies Medium gewechselt und nach weiteren 75 min die S<sup>35</sup>-markierten Proben dazugegeben.

### 2.2.4.8 ELISA („Enzyme-linked immunosorbent assay“)

Die Bestimmung der Konzentration an IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 im Überstand infizierter Zellen/Lungenkulturen erfolgte mittels kommerzieller „Sandwich“-ELISA. Dabei binden die vorhandenen Cytokine an spezifische Antikörper, mit denen der Boden einer 96-well Platte beschichtet ist. Nach der Antigenbindung wird ein weiterer Antikörper, der mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) kovalent verbunden ist und ebenfalls das Cytokin bindet, zugegeben. Die Menge der so gebildeten Antikörper-Cytokin-Antikörper-Komplexe wird durch die Zugabe eines chromogenen Substrates der HRP photometrisch bei 450 nm bestimmt.

Alle ELISA wurden nach den entsprechenden Herstellerangaben durchgeführt. Da die Cytokinkonzentration in den Lungenkulturen sehr hoch war, wurden die Lungenkulturüberstände für die ELISA wie folgt verdünnt eingesetzt: IFN- $\alpha$ : 1:3; IFN- $\beta$ : 1:2; IL-1 $\beta$ : 1:10; IL-6: 1:500; IL-8: 1:5000.

### 2.2.4.9 Multiplex-Cytokinassay

Die Bestimmung der sekretierten Cytokine TNF- $\alpha$ , IP-10, IFN- $\gamma$ , RANTES und MIP-1 $\beta$  im Überstand infizierter Zellen bzw. Lungenkulturen erfolgte mittels eines Multiplexassays. Im Gegensatz zu einem klassischen „Sandwich“-ELISA (s. 2.2.4.8) ermöglicht ein Multiplexassay das gleichzeitige Messen von bis zu 100 Cytokinen in einem einzigen Testansatz. Dabei binden die vorhandenen Cytokine an entsprechende Antikörper, die an fluoreszenzmarkierte Partikel kovalent gebunden sind. Die gebundenen Antigene werden mit einem biotinyliertem Antikörper, der spezifisch ein anderes Epitop erkennt, inkubiert. Diese Antikörper-Cytokin-Antikörper Partikel werden durch die Zugabe von Streptavidin-PE detektiert. Der Multiplexassay wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Infektiosität der virushaltigen Proben wurde vor der Durchführung durch Inkubation mit 0,15% TNBP/ 0,5% Triton-X-100 für 1 h

bei 4°C inaktiviert. Die Zellkulturüberstände wurden unverdünnt eingesetzt, die Überstände der Lungenkulturen wurden 1:9 in 0,5% BSA/RPMI verdünnt. Die Messung und Auswertung erfolgte auf einer Luminex100-Plattform mit Hilfe der Bio-Plex Manager™ Software. Für die Darstellung der Zellkulturdaten wurden klassische Balkendiagramme gewählt, während für die Darstellung der Lungenkulturdaten sogenannte „*Scatter plots*“ verwendet wurden, die die Variationen zwischen einzelnen Patienten verdeutlichen. Dabei sind Werte einzelner Patienten als Dreiecke und Mittelwerte aller Patienten als horizontale Linien dargestellt.

### 3 Ergebnisse

Während die meisten aviären und porzinen Viren im humanen Respirations-trakt stark restringiert sind, können sich saisonale, pandemische und hochpathogene H5N1-Influenzaviren effizient vermehren und lösen daher Erkrankungen aus (Beare *et al.* 1972; Beare und Webster 1991; de Jong *et al.* 2006; Shieh *et al.* 2010). Obwohl häufig untersucht, fehlt immer noch ein vollständiges Bild darüber, welche Faktoren die Speziesbarriere und die hohe Virulenz z. B. der hochpathogenen H5N1-Viren beeinflussen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher aviäre (niedrig und hochpathogene), porzine und humanpathogene Virusstämme hinsichtlich ihres Infektionsverhaltens in humanen respiratorischen Zellen systematisch verglichen werden. Mit dem Auftreten der neuen Influenzapandemie 2009 wurden zudem die Patienten-isolate A/Bayern/63/09 und A/Hamburg/4/09 mit in die Studie einbezogen (Übersicht aller verwendeten Viren Tab. 3.1).

**Tab. 3.1:** Übersicht der verwendeten Viren.

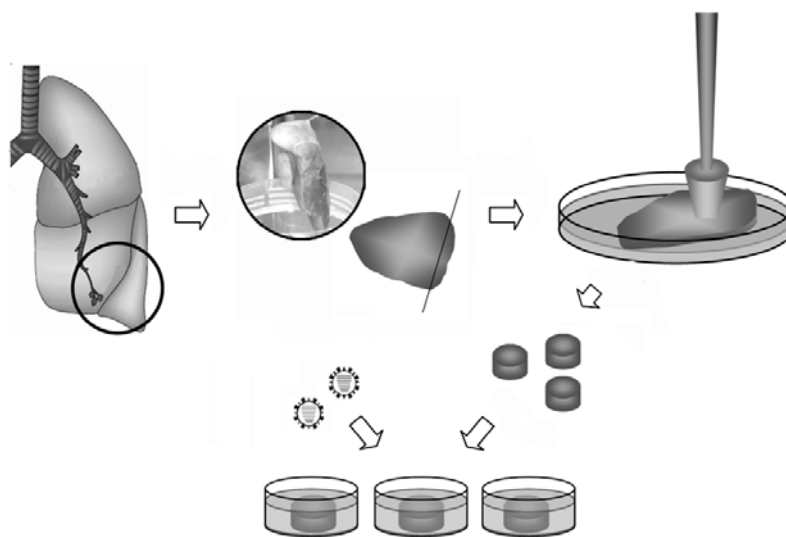
<u>Name</u>	<u>Subtyp</u>		<u>Abkürzung</u>
A/Panama/2007/1999	H3N2	saisonal	Pan/99
A/New Caledonia/20/1999	H1N1	saisonal	NC/99
A/Bayern/63/2009	H1N1	pandemisch	Bay/09
A/Hamburg/4/2009	H1N1	pandemisch	HH/09
A/Thailand/1(Kan-1)/2004	H5N1	hochpathogen	Thai/04
A/duck/Alberta/60/1976	H12N5	aviär	Dk/Alb
A/swine/Wisconsin/1/1967	H1N1	porzin	Sw/Wis

Um eine Untersuchung der Viren in authentischem humanem Lungengewebe vorzunehmen, wurde zunächst in enger Zusammenarbeit mit Anne Becher und Stefan Hippenstiel von der Med. Klinik m. S. Infektiologie und Pneumologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin ein humanes Lungenkulturmodell etabliert (Abschnitt 3.1). Die Vermehrungsfähigkeit der verschiedenen Viren wurde in diesen humanen Lungenkulturen und vergleichend in verschiedenen humanen permanenten und primären Zellen untersucht (Abschnitt 3.3) und mit dem Vorhandensein der entsprechenden Rezeptoren auf diesen Zellen in Verbindung gebracht (Abschnitt 3.2). Anschließend wurde die Expression und Lokalisation der viralen Proteine in infizierten Zellen (Abschnitt 3.4) sowie das

Knospen der Viren von der Zelloberfläche untersucht (Abschnitt 3.5). Zuletzt wurde die Aktivierung von Abwehrreaktionen der angeborenen Immunität durch die verschiedenen Viren anhand ihrer Cytokininduktion analysiert (Abschnitt 3.8) und der Zelltropismus der Viren charakterisiert (Abschnitt 3.9).

### 3.1 Etablierung eines humanen Lungenkulturmodells

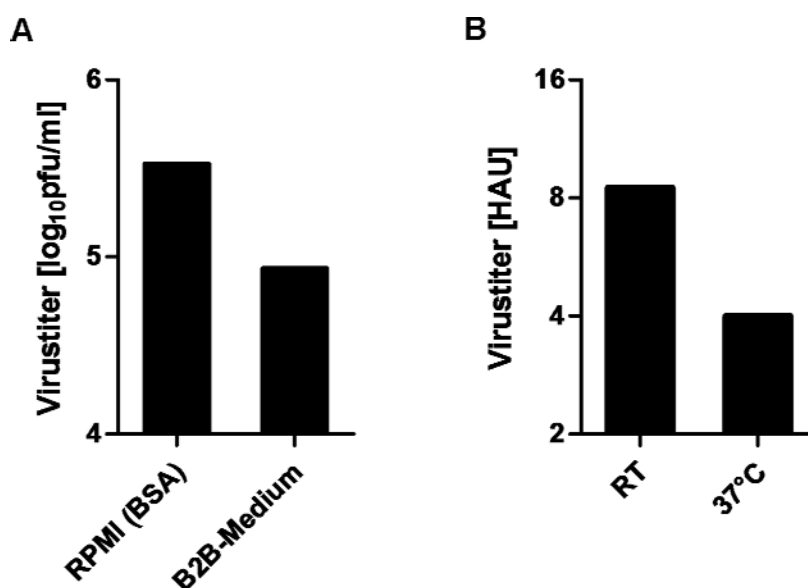
Der primäre Replikationsort von Influenzaviren beim Menschen ist der Respirationstrakt. Saisonale Influenzavirusinfektionen beschränken sich meist auf den oberen Respirationstrakt. Schwerverlaufende Infektionen mit humanpathogenen Influenzaviren sind jedoch häufig mit einer Verbreitung der Viren bis in den unteren Respirationstrakt verbunden. Ebenso wurde bei Patienten, die an einer Infektion mit hochpathogenen H5N1-Viren verstorben sind, das Virus aus dem unteren Respirationstrakt isoliert. Daher besitzt ein Infektionsmodell aus Lungengewebe besondere Bedeutung für das Studieren von schwerer Influenza.



**Abb. 3.1: Schematische Übersicht über die Präparation des Lungengewebes.** Lungengewebe wurde mit Hilfe eines Skalpells in dünne Scheiben und diese mit einer Biopsiestanze in etwa 8 mm große Stücke geschnitten. Die Lungenstücke wurden in 24-well Platten in RPMI-Kulturmedium bei 37°C über Nacht inkubiert und anschließend infiziert.

Der untere Respirationstrakt besteht aus einer Vielzahl verschiedener anatomischer Strukturen wie Alveolen und Bronchiolen und verschiedenen Zelltypen. Matrosovich *et al.* konnten in primären ausdifferenzierten Bronchialzellen zeigen, dass unterschiedliche Zelltypen in Abhängigkeit vom verwendeten Influenzastamm infiziert werden (Matrosovich *et al.* 2004). Zudem ist es wahr-

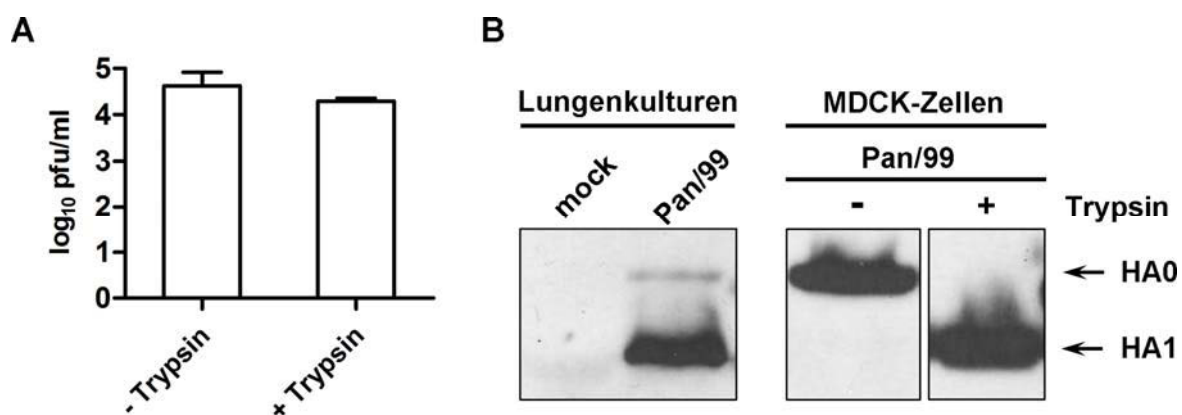
scheinlich, dass im Rahmen einer Influenzavirusinfektion die verschiedenen Zellen wie Alveolarmakrophagen und Epithelzellen miteinander kommunizieren, was für den Verlauf der Infektion essentiell sein könnte. Da sowohl die morphologische Struktur als auch die verschiedenen Zelltypen der humanen Lunge nur schwer durch die häufig benutzten permanenten Zelllinien wiedergegeben werden, wurde zu Beginn dieser Arbeit ein humanes *ex vivo* Lungenkultursystem etabliert, welches das Studium einer Influenzavirusinfektion in einem komplexen Modell mit allen beteiligten Zellen in authentischem Lungengewebe ermöglicht. Die Etablierung dieses Modells war nur durch die sehr enge Zusammenarbeit von Pneumologen, Infektiologen und Virologen möglich. Das im Rahmen einer Lungenoperation am HELIOS-Klinikum entnommene tumorfreie humane Lungengewebe wurde mit einer Biopsiestanze in kleinere Stücke (~ 3 x 8 x 8 mm) zerteilt, gewaschen und anschließend in RPMI-Medium (0,3% BSA) über Nacht bei 37°C inkubiert (Abb. 3.1). Am nächsten Tag erfolgte die Infektion, deren Zeitpunkt im Folgenden als Zeitpunkt 0 h angegeben wird.



**Abb. 3.2: Etablierung eines humanen Lungenkulturmodells.** (A) Lungenstücke wurden in RPMI-Kulturmedium (RPMI (BSA)) bzw. in B2B-Medium bei 37°C über Nacht inkubiert und anschließend infiziert. 72 h nach der Infektion wurde die Virusmenge im Überstand mittels Plaque test auf MDCK-Zellen ermittelt. (B) Lungenkulturen wurden entweder bei Raumtemperatur (RT) oder bei 37°C (37°C) mit der Viruslösung inkubiert. Nach der Infektion wurden die Lungenkulturen bei 37°C in RPMI (BSA) inkubiert und die Virusmenge im Überstand nach 96 h mittels HA-Test ermittelt. Dargestellt sind Daten einer Patientenprobe.

Für die Inkubation der Lungenstücke wurden verschiedene Medien ausgetestet. So wurde neben dem später verwendeten RPMI (+ 0,3% BSA) auch RPMI

(+ 10% FCS), DMEM (+ 0,3% BSA), DMEM (+ 10% FCS) und B2B-Medium (s. 2.1.7.2) getestet. Dabei wurde einerseits ein Vitalitätstest der Lungenkulturen durch unsere Kooperationspartner mittels LDH-Bestimmung durchgeführt, andererseits mittels Hämagglutinationstest (HA-Test) die besten Replikationsbedingungen für das saisonale Influenzavirus in den Lungenkulturen ermittelt. RPMI-Medium mit BSA stellte sich als am besten geeignet heraus, da die Inkubation in diesem kaum zu einer Abnahme der Vitalität der Lungenkulturen mit der Zeit führte und die höchsten Virustiter im Überstand gemessen wurden. Des Weiteren wurden die Infektionsbedingungen optimiert. Da die Infektion bei Raumtemperatur (RT) etwas effizienter erfolgte als bei 37°C, wurden die Lungenkulturen im Folgenden bei RT infiziert. (Abb. 3.2, Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend ergaben sich für die Infektion des Lungengewebes eine Infektionsdosis von  $4 \times 10^5$  pfu in RPMI-Medium in einem Gesamtvolumen von 500 µl und eine Infektionsdauer von 1 h bei RT.

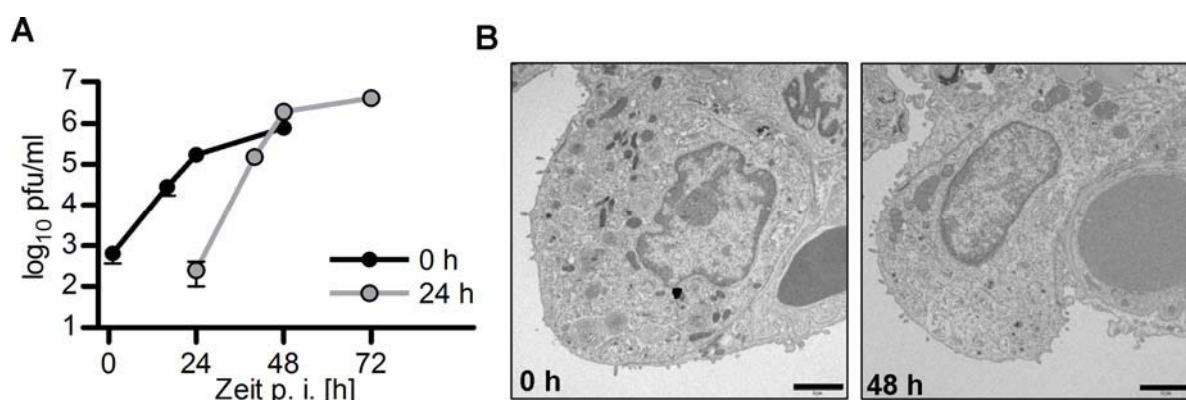


**Abb. 3.3: Nachweis HA-spaltender Aktivität in den Lungenkulturen.** (A) Lungenkulturen wurden mit Pan/99 infiziert ( $4 \times 10^5$  pfu), anschließend mit und ohne Trypsin (1 µg/ml) inkubiert und die Virusmenge im Überstand mittels Plaquetest auf MDCK-Zellen bestimmt. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  SEM von Triplikaten einer Patientenprobe. (B) Virionen im Überstand infizierter Lungenkulturen (Pan/99,  $5 \times 10^6$  pfu), die ohne Trypsin inkubiert worden waren, wurden präzipitiert und mit Hilfe eines monoklonalen H3-Antikörpers im Westernblot auf das Vorhandensein von gespaltenem HA-Protein untersucht. Als Kontrolle wurden Virionen aus dem Überstand infizierter MDCK-Zellen aufgereinigt, mit (+) bzw. ohne (-) Trypsin behandelt und HA0 und HA1 im Westernblot dargestellt.

Humane und niedrigpathogene aviäre Influenzaviren besitzen im Oberflächenprotein Hämagglutinin (HA) eine monobasische Spaltstelle, die nicht durch intrazelluläre Proteasen erkannt und gespalten werden kann. Zur Spaltung des HAs bedarf es daher im Respirationstrakt exprimierter trypsinähnlicher Proteasen oder exogen zugefügtem Trypsin. Um zu untersuchen, ob im Lungenmodell entsprechende Proteasen vorhanden sind und ob deren Aktivität



für eine Spaltung ausreichend ist, wurde die Replikation des saisonalen Virus (Pan/99) mit und ohne die Zugabe von TPCK-Trypsin (L-1-Tosylamido-2-phenylethylchloromethyl Keton behandeltes Trypsin) im Medium untersucht (Abb. 3.3 A). Zudem wurden die gebildeten Viruspartikel auf das Vorhandensein von gespaltenen HA-Proteinen untersucht (Abb. 3.3 B). Dazu wurden die Virionen im Überstand infizierter Lungenkulturen mittels Ultrazentrifugation aufgereinigt, über SDS-PAGE aufgetrennt und per Westernblotanalyse mit Hilfe eines H3-Antikörpers das gespaltene HA1-Protein nachgewiesen. Wie in Abb. 3.3 A dargestellt, ergaben sich durch die Zugabe von Trypsin in Bezug auf das Replikationsverhalten kaum Unterschiede für das getestete saisonale Virus. Auch in aus Lungenkulturen isolierten Virionen war ein deutlich gespaltenes HA nachweisbar (Abb. 3.3 B). Daher wurde für die folgenden Versuche kein Trypsin zu den Infektionsansätzen gegeben.



**Abb. 3.4: Strukturelle und funktionelle Analyse der Lungenkulturen.** (A) Lungenkulturen wurden entweder zum Zeitpunkt 0 (0 h) oder 24 h (24 h) mit Pan/99 infiziert und die Virusmenge im Überstand zu den Zeitpunkten 0, 16, 24, 48 und 72 h mittels Plaquetest auf MDCK-Zellen bestimmt. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  SEM von Triplikaten einer Patientenprobe. (B) Elektronenmikroskopische Darstellung eines Pneumozyten direkt nach der Präparation (0 h) und nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C (48 h). Maßstab: 2  $\mu$ m.

Wie in Abb. 3.4 dargestellt, konnte im zeitlichen Verlauf etwa 48 h nach der Infektion keine weitere Zunahme der Replikation festgestellt werden. Um auszuschließen, dass dies nicht durch ein Absterben der Zellen oder eine Verringerung der Stoffwechselaktivität z. B. durch unzureichende Versorgung des Gewebes verursacht wurde, wurden die Lungenkulturen elektronenmikroskopisch untersucht und Vermehrungskurven zu unterschiedlichen Zeitpunkten angelegt (Abb. 3.4). Dabei wurden Kulturen zum Zeitpunkt 0 h infiziert (schwarze Kurve) oder 24 h später (graue Kurve). Dies entspricht genau dem Zeitpunkt an dem bei einer Infektion nach 0 h (schwarze Kurve) bereits eine

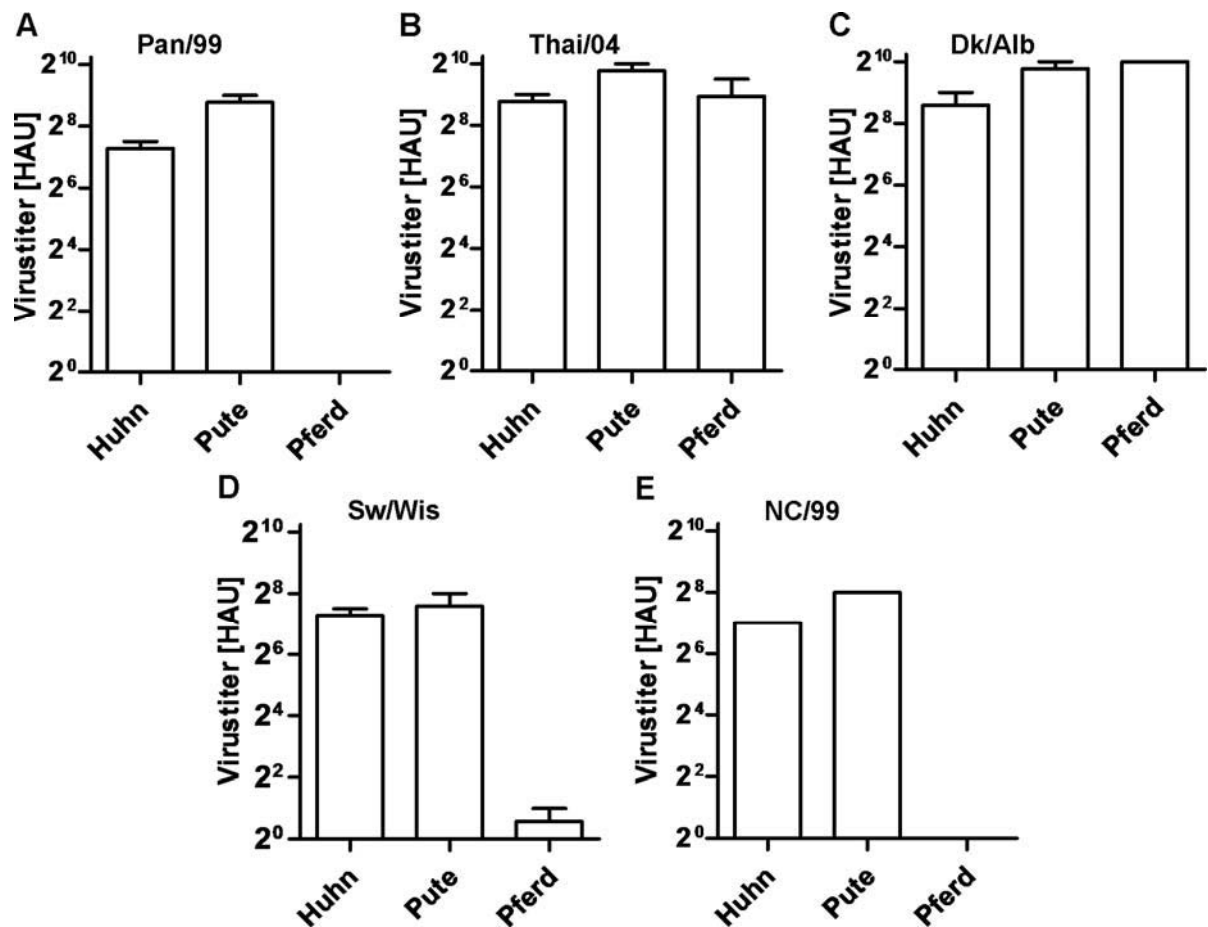
deutliche Abflachung des Titeranstieges zu erkennen ist. Im Vergleich zeigte die Kurve des zweiten Ansatzes einen ähnlichen Verlauf, so dass die Fähigkeit zur Virusvermehrung offenbar über mindestens 48 h stabil bleibt. Dieser Befund wurde in elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigt, in denen sich keine Änderung der regulären Struktur des Lungengewebes auch 48 h nach der Präparation zeigten (Abb. 3.4 B).

Zusammenfassend war es möglich ein Lungenkulturmodell zu etablieren mit dessen Hilfe Influenzavirusinfektionen in authentischem humanem Lungengewebe untersucht werden können.

### **3.2 Expression aviärer und humaner Influenzavirusrezeptoren auf humanen Zellen**

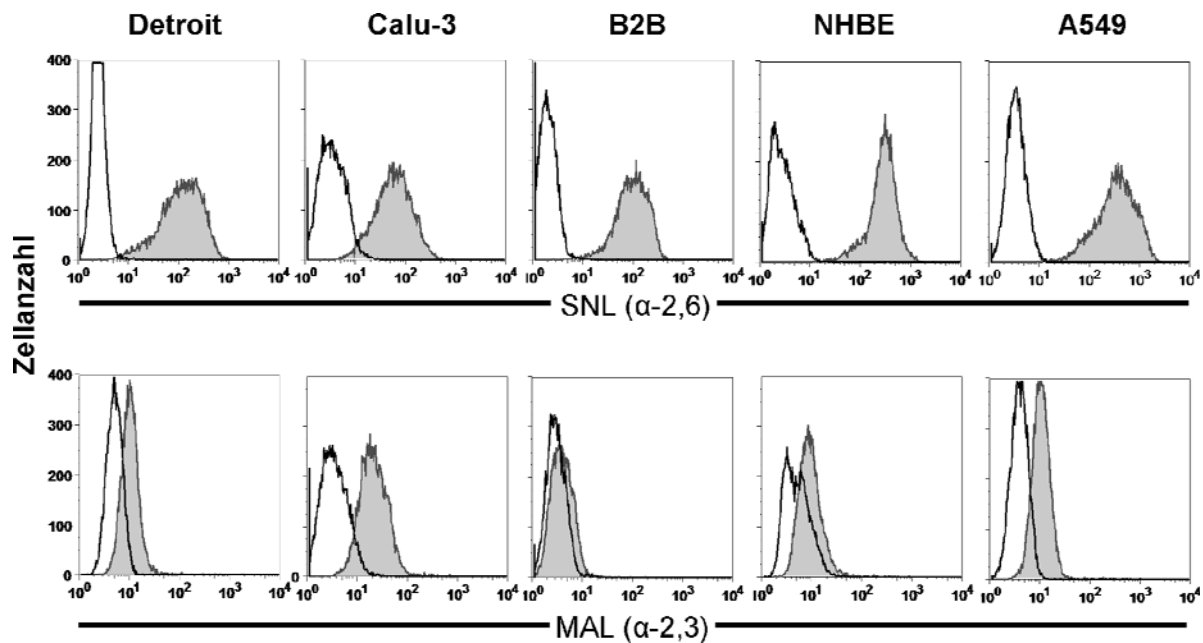
Lange Zeit wurden Unterschiede in den Rezeptoren aviärer und humaner Influenzaviren dafür verantwortlich gemacht, dass sich aviäre Viren nicht effektiv in humanen Zellen replizieren (Kuiken *et al.* 2006). Während aviäre Viren an SA $\alpha$ -2,3Gal binden, präferieren humane Viren SA $\alpha$ -2,6Gal. Daher wurden im Folgenden die Rezeptorpräferenz der Viren und die Rezeptorexpression der verwendeten Zellen untersucht.

Zur Untersuchung der Rezeptorpräferenz der verwendeten Viren wurden HA-Tests mit Hühner-, Puten- und Pferdeerythrozyten durchgeführt. Das niedrigpathogene aviäre (Dk/Alb) sowie das H5N1-Virus (Thai/04) führten zu einer deutlichen Agglutination der Pferdeerythrozyten, die vorwiegend SA $\alpha$ -2,3Gal auf ihrer Oberfläche tragen. Dagegen konnten die saisonalen Viren (Pan/99, NC/99) Pferdeerythrozyten nicht agglutinieren. Das klassische Schweinevirus (Sw/Wis) agglutinierte Pferdeerythrozyten nur zu sehr geringen Titern (Abb. 3.5). Dagegen waren alle Viren fähig Hühner- und Putenerythrozyten zu agglutinieren, die sowohl SA $\alpha$ -2,3Gal als auch SA $\alpha$ -2,6Gal auf ihrer Oberfläche tragen.



**Abb. 3.5: Hämagglutination von Hühner-, Puten- und Pferdeerythrozyten durch saisonale, aviäre und porcine Influenzaviren.** Hühner-, Puten- und Pferdeerythrozyten wurden 1:1 mit den unverdünnten Virusstocks Pan/99 (A) , Thai/04 (B) , Dk/Alb (C), Sw/Wis (D) und NC/99 (E) inkubiert und auf ihre Fähigkeit zur Hämagglutination untersucht. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  SEM von zwei Experimenten.

Um die Expression von SA $\alpha$ -2,3Gal bzw. SA $\alpha$ -2,6Gal auf den Zelloberflächen zu untersuchen wurden FACS-Analysen mit sialylsäurebindenden Lektinen durchgeführt. Alle untersuchten Zelllinien sowie NHBE-Zellen exprimierten den humanen Rezeptor (Abb. 3.6, obere Zeile). Zudem exprimierten A549-, Calu-3-, Detroit- und NHBE-Zellen auch den aviären Rezeptor (Abb. 3.6, untere Zeile). Das Vorhandensein humaner und aviärer Rezeptoren im unteren Respirationstrakt konnte bereits von Shinya *et al.* (Shinya *et al.* 2006) gezeigt und von unseren Kooperationspartnern in den Lungenkulturen bestätigt werden (Ergebnisse Anne Becher).



**Abb. 3.6: Expression von SA $\alpha$ -2,6 Gal und SA $\alpha$ -2,3Gal auf Detroit-, Calu-3-, B2B-, NHBE- und A549-Zellen.** Detroit-, Calu-3-, B2B-, NHBE- und A549-Zellen wurden mit Sambucus nigra Agglutinin (SNL, FITC gekoppelt) zur Darstellung von SA $\alpha$ -2,6Gal und mit Maackia amurensis Agglutinin (MAL, PE gekoppelt) zum Nachweis von SA $\alpha$ -2,3Gal inkubiert. Dargestellt sind mit dem jeweiligen Lektin gefärbte Zellen (grau) im Vergleich zu kontrollgefärbten Zellen (schwarze Linie).

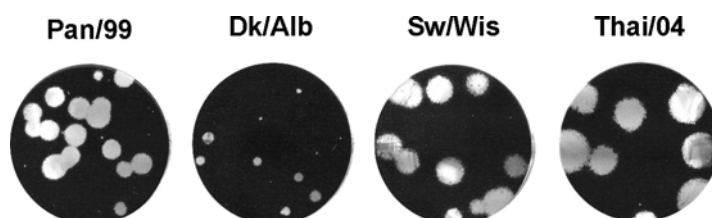
Zusammenfassend zeigen Dk/Alb und Thai/04 eine hohe Rezeptorpräferenz für den aviären Rezeptor während saisonale Viren diesen nicht binden. Die verwendeten Zellen exprimieren mit Ausnahme der B2B-Zellen sowohl den aviären als auch den humanen Rezeptor.

### 3.3 Replikation aviärer, porciner und saisonaler Influenzaviren in humanen Zell- und Lungenkulturen

Saisonale, pandemische und hochpathogene Influenzaviren replizieren im humanen Respirationstrakt. Dagegen zeigte eine Studie von 1991, dass sich die meisten aviären Influenzaviren nicht effektiv im humanen Respirationstrakt vermehren (Beare und Webster 1991). Auch klassische Schweineviren führten in experimentell infizierten Freiwilligen zu keinen oder nur sehr geringen Anzeichen einer Infektion (Beare *et al.* 1972).

Im Folgenden wurde die Vermehrung der verschiedenen Virusstämme in verschiedenen humanen Zellen des Respirationstraktes und im Lungenmodell untersucht. Alle Virusstämme führten auf MDCK-Zellen zur Bildung von Plaques (Abb. 3.7), so dass zur Bestimmung der Virusmenge im Überstand der Stan-

dartplaqueassay auf MDCK-Zellen verwendet werden konnte. Hinsichtlich der Plaquemorphologie ergaben sich bereits erste Unterschiede zwischen den Viren. Während Pan/99 deutliche klar abgrenzbare Plaques bildet, sind die Plaques des hochpathogenen Thai/04-Virus eher ausgefranst. Im Gegensatz zu Pan/99 und Thai/04 bildet Dk/Alb nur sehr kleine Plaques (Abb. 3.7).



**Abb. 3.7: Plaquegröße saisonaler, aviärer und porziner Virusstämme auf MDCK-Zellen.** MDCK-Zellen wurden mit den angegebenen Viren infiziert, anschließend 48 h mit Avicel-Overlay Medium inkubiert und die Plaques mittels Kristallviolett visualisiert.

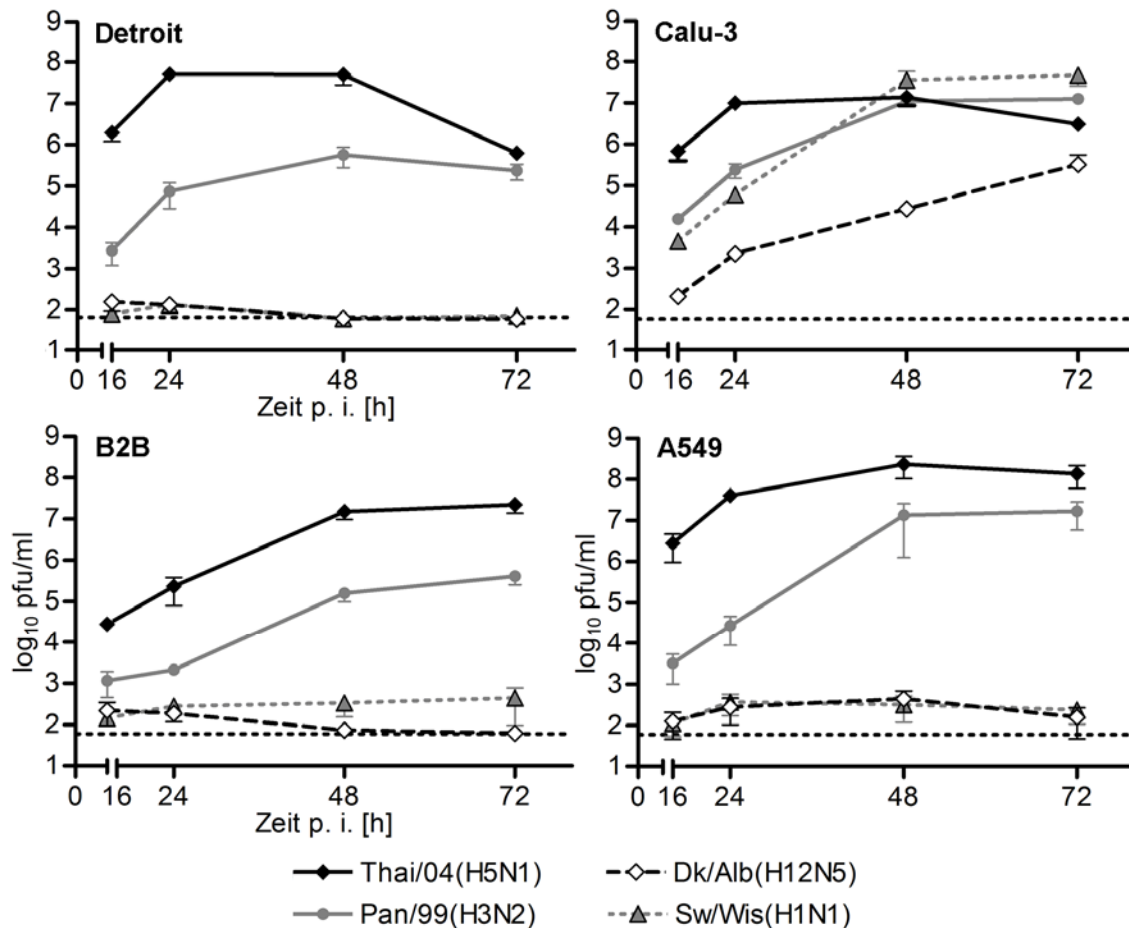
### 3.3.1 Replikation in Zellkulturen des oberen und unteren Respirationstraktes

Für die Replikationskurven wurden die in 12-well ausgesäten Zellen mit einer  $moi$  von 0,01 infiziert und zu definierten Zeitpunkten (16, 24, 48, 72 h p. i.) Überstände gesammelt. Sofern die Zellen keine endogene Protease exprimierten, wurde dem Zellkulturüberstand TPCK-Trypsin zugegeben (entsprechend Abb. 3.8 A). Die Virusmenge in Zellkulturüberständen wurde mittels Plaque-test auf MDCK-Zellen bestimmt. Das hochpathogene H5N1-Virus (Thai/04) zeigte eine sehr effektive Replikationsfähigkeit in Detroit-Zellen des oberen Respirationstraktes. Die erreichten Titer von fast  $10^8$  pfu/ml lagen etwa zwei Logstufen über den Titern des saisonalen H3N2-Virus (Pan/99). Im Gegensatz dazu replizierten das niedrigpathogene aviäre Virus (Dk/Alb) und das klassische Schweinevirus (Sw/Wis) nahezu nicht in Zellen des oberen Respirationstraktes (Abb. 3.8 B). Für die Virusvermehrung in Zellen des unteren Respirationstraktes ergab sich ein ähnliches Bild. Das hochpathogene Thai/04-Virus replizierte sowohl in den bronchiolaren B2B- und Calu-3-Zellen als auch den alveolaren A549-Zellen zu sehr hohen Titern. Im Gegensatz dazu zeigte das niedrigpathogene aviäre Dk/Alb-Virus weder in B2B- noch in A549-Zellen eine effiziente Replikation. Lediglich in Calu-3-Zellen replizierte Dk/Alb zu Titern über  $10^5$  pfu/ml.

A

	Detroit	Calu-3	B2B	A549	NHBE	Lungenkultur
Trypsin µg/ml	0,2	-	1	0,2	-	-

B

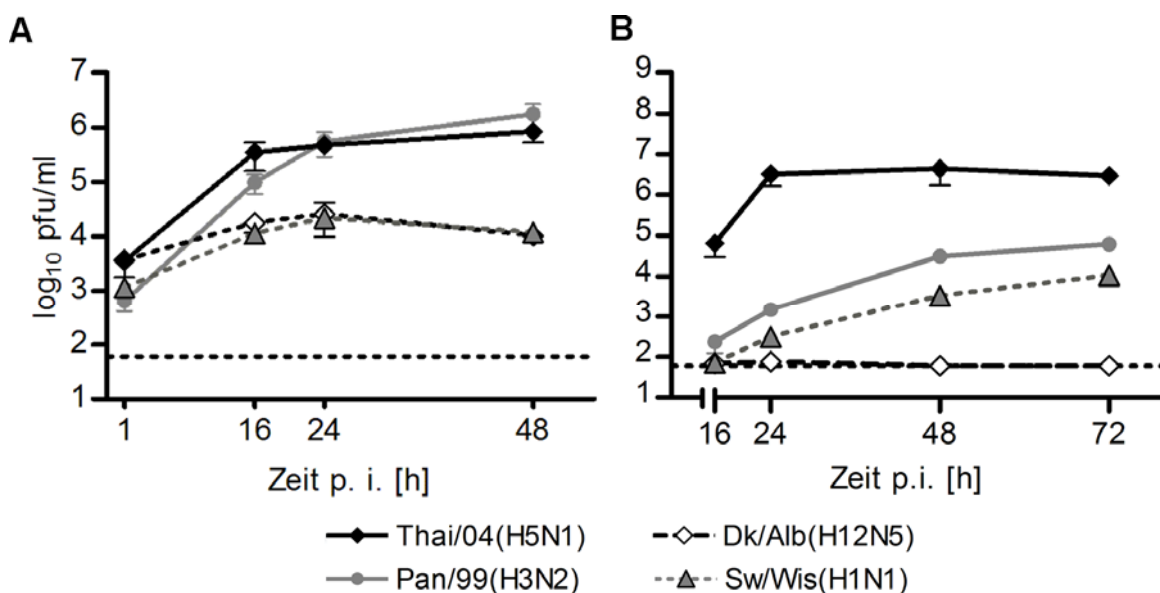


**Abb. 3.8: Replikation saisonaler, aviärer und porciner Influenzaviren in humanen permanenten respiratorischen Zelllinien.** Detroit-, Calu-3-, B2B- und A549-Zellen wurden mit den angegebenen Virusstämmen infiziert (moi 0,01), in Medium mit TPCK-Trypsin (A) inkubiert und die Virustiter im Zellüberstand nach 16, 24, 48 und 72 h mittels Plaquetest auf MDCK-Zellen bestimmt (B). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte einer Doppelbestimmung  $\pm$  SEM von zwei unabhängigen Experimenten. Die Nachweisgrenze lag bei 60 pfu/ml (gestrichelte Linie).

Auffällig ist, dass das klassische Schweinevirus (Sw/Wis) mit Titern von über  $10^7$  pfu/ml in Calu-3-Zellen genauso effizient wie das saisonale Pan/99-Virus replizierte. Im Gegensatz dazu replizierte es in B2B- und A549-Zellen kaum (Abb. 3.8 B).

### 3.3.2 Replikation in primären Zellen und Lungenkulturen

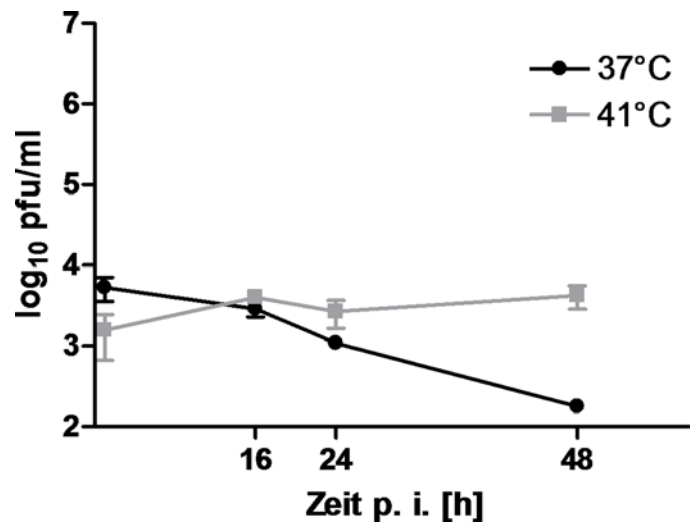
NHBE-Zellen wurden mit einer moi von 0,01 und die Lungenkulturen mit  $4 \times 10^5$  pfu pro Stück (ca. 100 mg Gewebe) infiziert und die Überstände zu den angegebenen Zeitpunkten genommen. Die mittels Plaquetest auf MDCK-Zellen bestimmte Virusmenge im Überstand ist in Abb. 3.9 dargestellt.



**Abb. 3.9: Replikation saisonaler, aviärer und porziner Viren in Lungenkulturen (A) und primären NHBE-Zellen (B).** Lungenkulturen bzw. NHBE-Zellen wurden mit den angegebenen Viren infiziert ( $4 \times 10^5$  pfu bzw. moi 0,01) und die Virusmenge im Überstand nach 0, 16, 24 und 48 h (und 72 h) mittels Plaquetest auf MDCK-Zellen bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von Triplikaten aus 6 (A) bzw. von Duplikaten aus zwei (B) unabhängigen Experimenten. Die Nachweisgrenze lag bei 60 pfu/ml (gestrichelte Linie).

Sowohl in primären NHBE-Zellen als auch in Lungenkulturen replizierte das hochpathogene H5N1-Virus (Thai/04) zu hohen Titern. Im Gegensatz dazu vermehrte sich das niedrigpathogene Virus (Dk/Alb) und das klassische Schweinevirus (Sw/Wis) nur zu sehr geringen Titern. Auffällig ist, dass in NHBE-Zellen das H5N1-Virus zu deutlich höheren Titern als das saisonale Virus replizierte, während im Lungenmodell sich beide Viren zu nahezu gleichen Titern vermehrten.

Da aviäre Viren unter natürlichen Bedingungen im Gastrointestinaltrakt von Vögeln bei etwa 41°C replizieren, wurde getestet, ob das aviäre Virus bei höheren Temperaturen als den im humanen unteren Respirationstrakt üblichen 37°C effizienter repliziert. Dazu wurden Lungenkulturen mit Dk/Alb infiziert und anschließend entweder bei 37°C oder bei 41°C inkubiert.

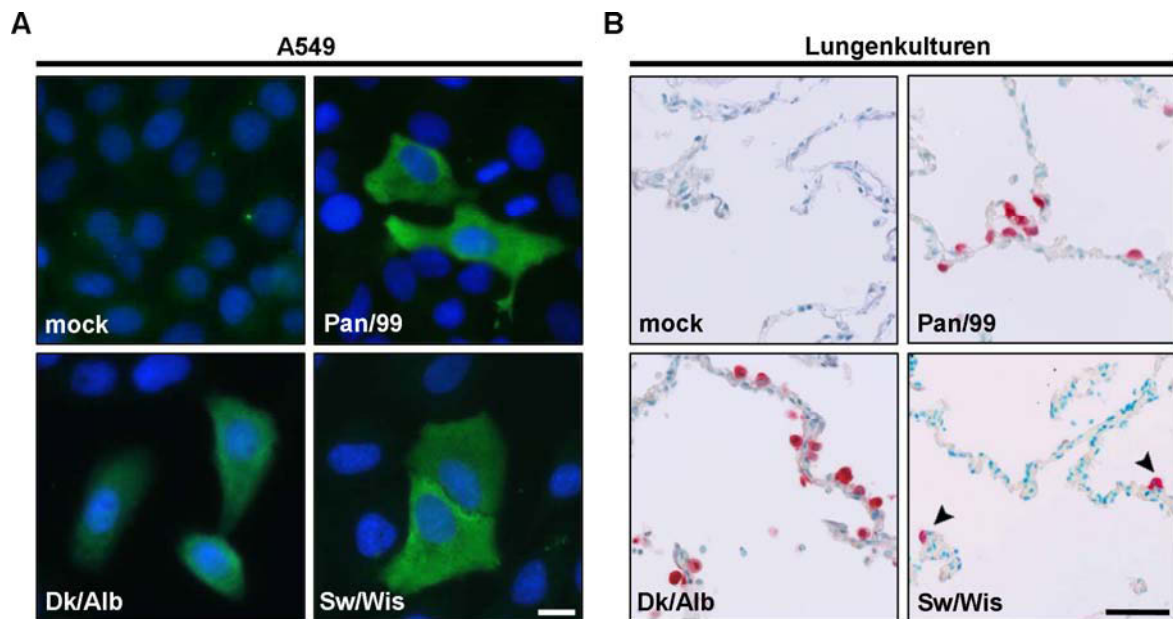


**Abb. 3.10: Replikation des niedrigpathogenen aviären Influenzavirus in Lungenkulturen bei 37°C bzw. 41°C.** Lungenkulturen wurden mit Dk/Alb infiziert und anschließend entweder bei 37°C oder bei 41°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Virusmenge im Überstand mittels Plaquetest auf MDCK-Zellen bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von Triplikaten einer Patientenprobe.

Wie in Abb. 3.10 dargestellt replizierte das niedrigpathogene Virus jedoch auch bei einer erhöhten Temperatur von 41°C nicht effizient.

Während saisonale Viren und hochpathogene H5N1-Viren also sowohl effizient in Zellkulturen des humanen Respirationstraktes als auch in primären NHBE-Zellen und Lungenkulturen replizieren, vermehrten sich ein niedrigpathogenes aviäres Virus und ein klassisches porcines Virus dort nicht oder nur sehr ineffizient. Trotz dieser ineffizienten Replikation des aviären (Dk/Alb) und porcinen (Sw/Wis) Virus konnte virales NS1-Protein in A549-Zellen mittels Immunfluoreszenzanalyse nachgewiesen werden. Ebenso konnten deutlich Influenza-Antigen-positive Zellen in den Lungenkulturen nach Infektion mit Dk/Alb und Sw/Wis mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden. Damit können sowohl aviäre als auch porcine Viren an die vorhandenen Rezeptoren binden, in die Zellen aufgenommen werden und virale Proteine in diesen produzieren.

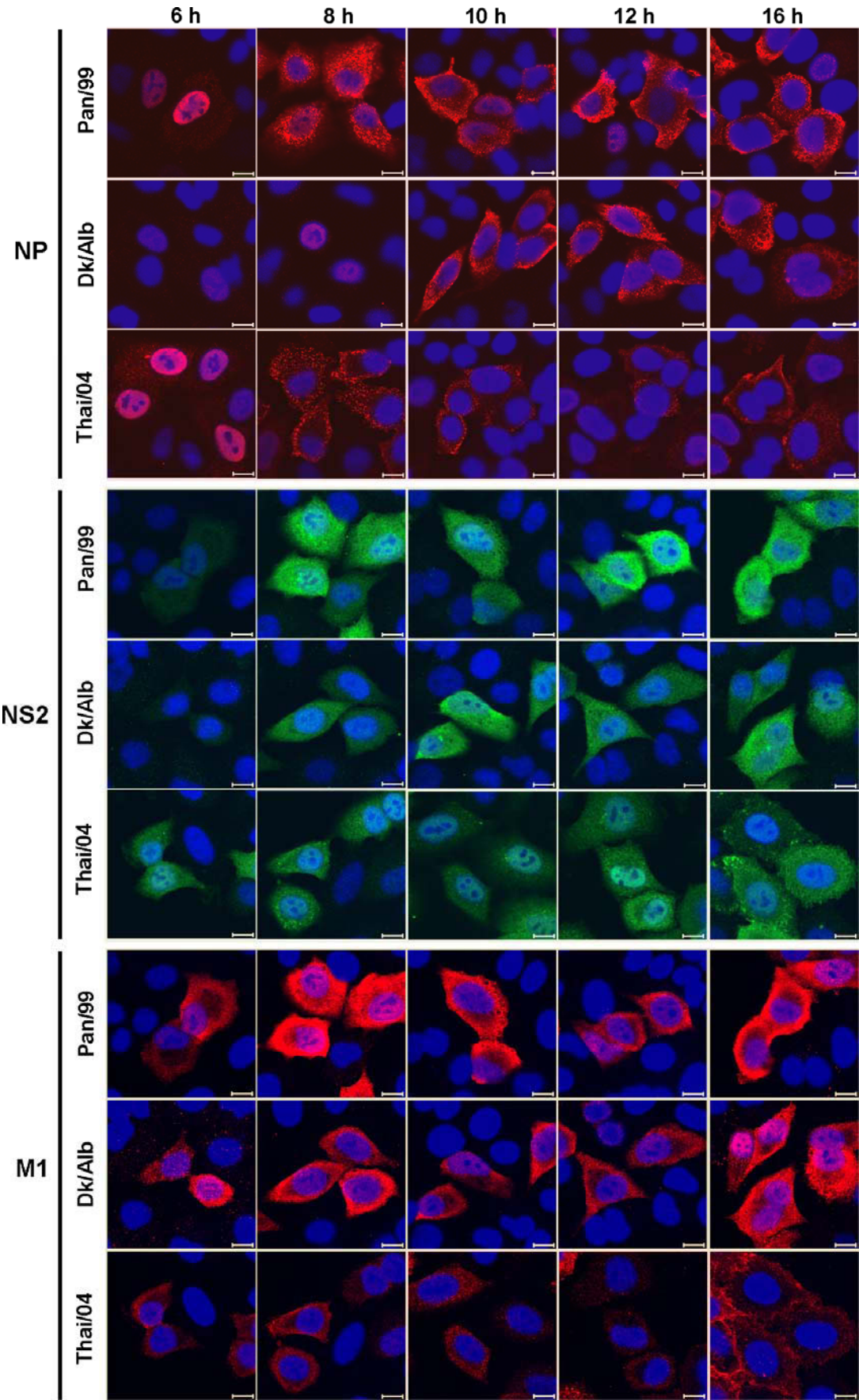




**Abb. 3.11: Nachweis viraler Proteine in infizierten A549-Zellen und Lungenkulturen.** A549-Zellen und Lungenkulturen wurden mit den angegebenen Viren infiziert. (A) 8 h p. i. wurden die infizierten A549-Zellen fixiert, permeabilisiert und mit einem polyklonalen NS1-Antikörper und entsprechenden Alexa-488 gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert und NS1 (grün) detektiert. Darstellung der Zellkerne: DAPI. Maßstab: 10  $\mu$ m. (B) 24 h p. i. wurden die infizierten Lungenkulturen fixiert, für die immunhistologische Analyse aufbereitet und mit einem polyklonalen Influenzavirionantikörper (rot) influenzapozitive Zellen dargestellt. Gegenfärbung: Methylgrün. Maßstab: 50  $\mu$ m (Bild (B): Anne Becher).

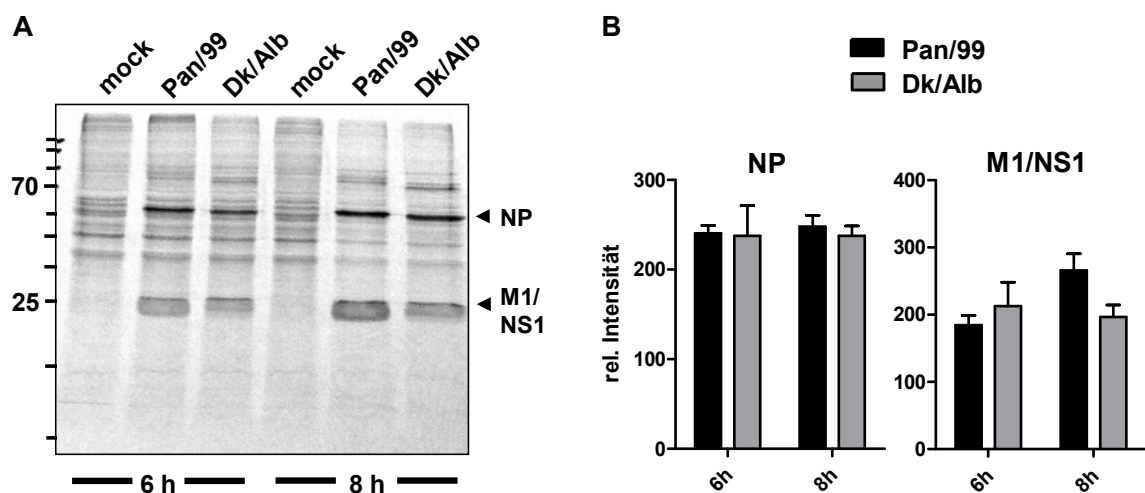
### 3.4 Expression und Lokalisation viraler Proteine in A549-Zellen

Da aviäre Rezeptoren auf den Zellen exprimiert werden, aviäre Viren in Zellen aber trotz erfolgter Infektion nur ineffektiv replizieren (Abb. 3.8, Abb. 3.11), wurde im Folgenden untersucht, ob virale aviäre Proteine sich hinsichtlich Lokalisation und Expression von saisonalen und hochpathogenen H5N1-Viren unterscheiden. Hierzu wurden Immunfluoreszenzanalysen und „pulse labeling“ Experimente an A549-Zellen durchgeführt. Letztere wurden gewählt, da das Replikationsverhalten der Viren auf A549-Zellen dem der Lungenkulturen am ähnlichsten ist und sie zudem vom Zelltyp (als von Pneumozyten-abgeleitete Zelllinie) den Zellen der Lungenkultur am nächsten sind.



**Abb. 3.12: Lokalisation der viralen Proteine NP, NS2 und M1 im Infektionsverlauf.** A549-Zellen wurden mit den angegebenen Viren infiziert (moi 1) und nach 6, 8, 10, 12 und 16 h fixiert. Anschließend wurden die Proteine mittels der indirekten Immunfluoreszenzanalyse mit spezifischen Antikörpern für NP, NS2, M1 und entsprechenden fluorophorgekoppelten Sekundärantikörpern nachgewiesen. Darstellung der Zellkerne: DAPI. Maßstab: 10 µm.

Die Immunfluoreszenzanalyse zeigte, dass die viralen Proteine NP, NS2 und M1 zu den Zeitpunkten 6, 8, 10, 12 und 16 h nach Infektion exprimiert wurden. NP war zu frühen Zeitpunkten im Zellkern und zu späteren Zeitpunkten im Zytoplasma nachweisbar. Die Proteine NS2 und M1 waren zu allen Zeitpunkten sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma vorhanden. Damit zeigten alle untersuchten Virusproteine die zu den entsprechenden Zeitpunkten zu erwartende Lokalisation und es fanden sich keine Unterschiede zwischen den drei Stämmen. Um die Expression der viralen Proteine der saisonalen und aviären Stämme unabhängig von Antikörpern quantitativ zu vergleichen, wurden diese 6 oder 8 h nach der Infektion mittels eines „pulse labeling“-Experimentes mit  $^{35}\text{S}$ -markiertem Methionin/Cystein nachgewiesen. Sowohl in Pan/99- als auch in Dk/Alb-infizierten Zellen waren NP (~55 kDa) und M1/NS1, die sich aufgrund ihrer ähnlichen Molekulargewichte nicht eindeutig trennen ließen (M1:27,9 kDa; NS1:26,1 kDa), deutlich nachweisbar. Die Intensität der Banden zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Pan/99- und Dk/Alb-infizierten Zellen (Abb. 3.13).

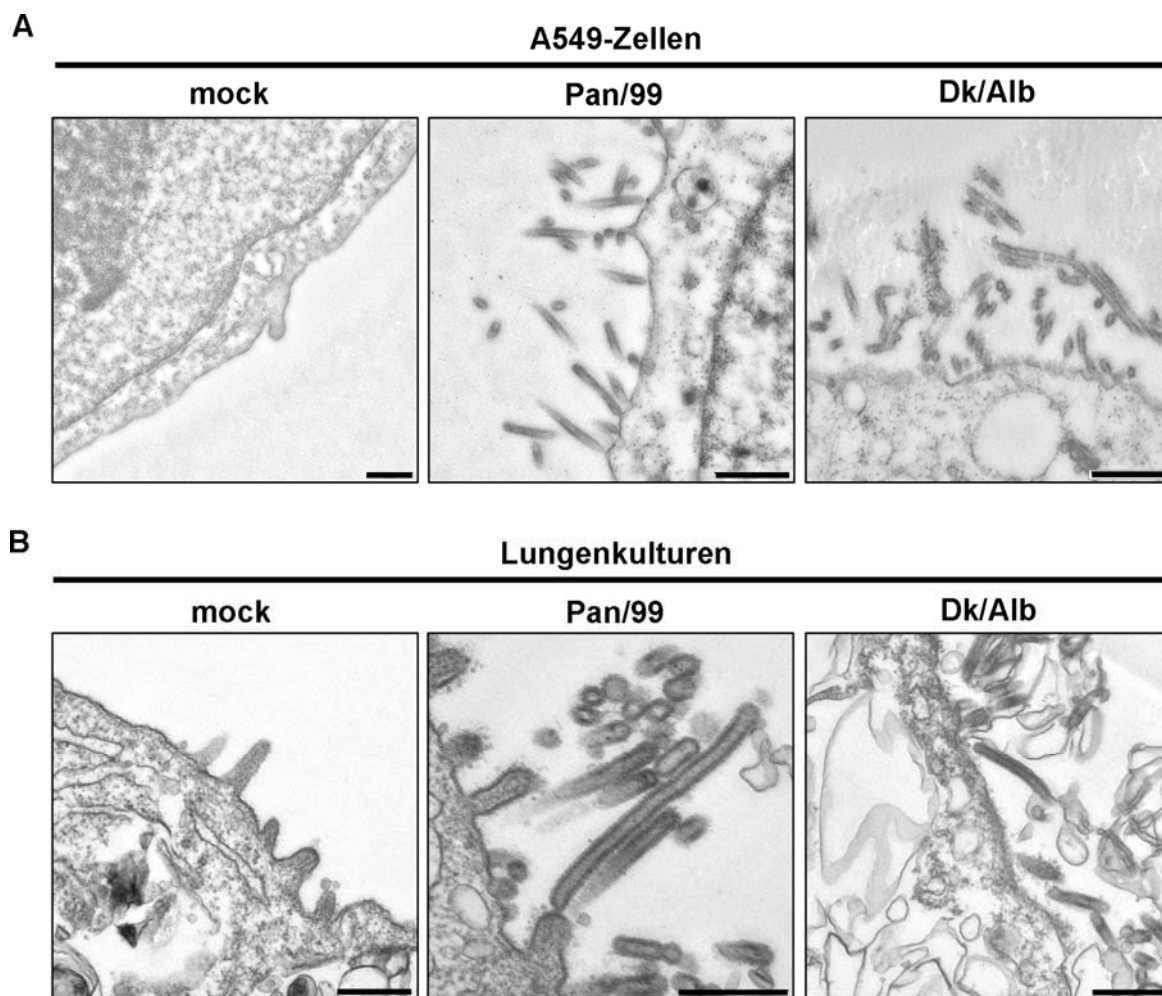


**Abb. 3.13: Nachweis der viralen und zellulären Proteinsynthese 6 und 8 h nach Infektion.** (A) A549-Zellen wurden mit den angegebenen Viren mit einer moi von 5 infiziert. Nach 6 bzw. 8 h wurden die Zellen mit  $^{35}\text{S}$ -markiertem Methionin/Cystein (30 µCi) für 30 min inkubiert, anschließend lysiert, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und über Autoradiographie detektiert. (B) Densitometrische Auswertung der markierten Banden. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von zwei unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend ließen sich sowohl für die Lokalisierung als auch die Expressionsstärke der viralen Proteine keine Unterschiede zwischen einer Infektion mit dem aviären und dem saisonalen Virus erkennen.

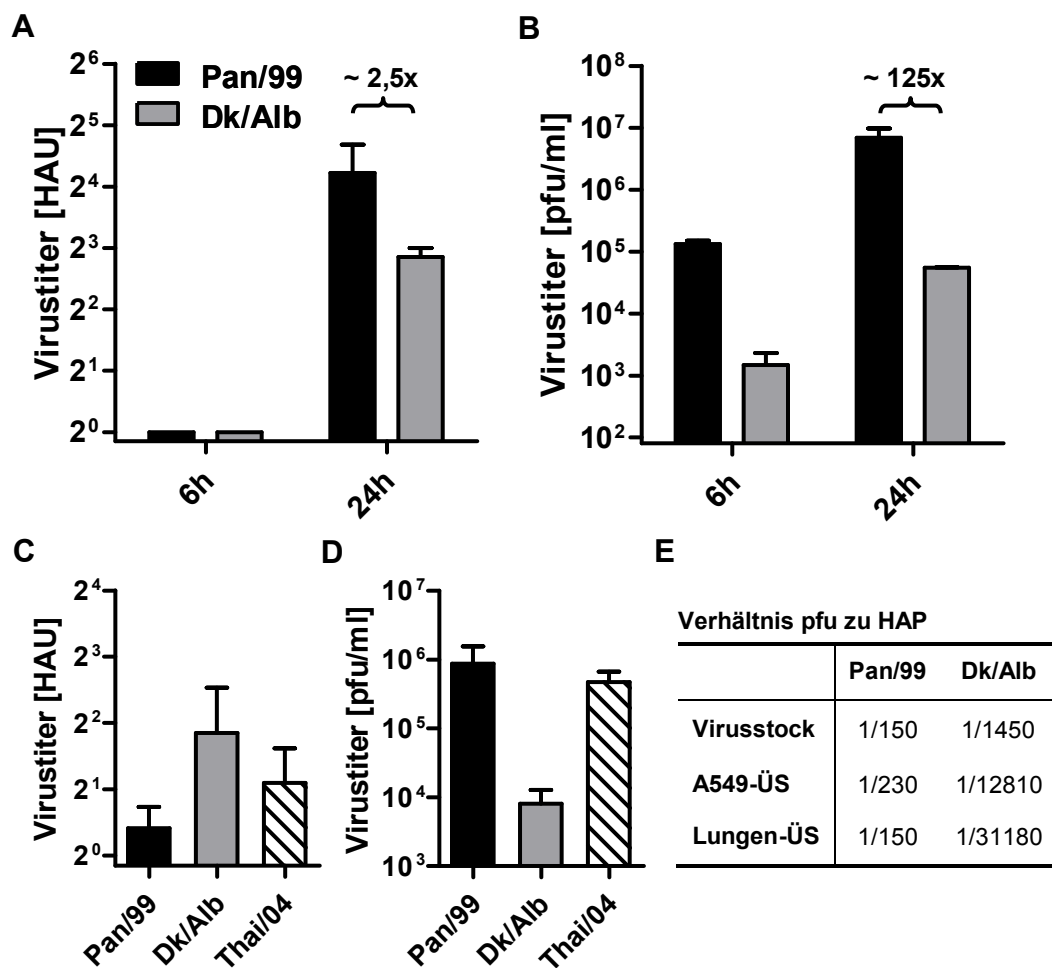
### 3.5 Nachweis von Viruspartikeln im Überstand von A549-Zellen und Lungenkulturen nach Infektion mit Dk/Alb

Da virale Proteine sowohl nach Infektion mit Pan/99 als auch Dk/Alb mit gleicher Intensität exprimiert wurden, sich beide Viren aber dennoch erheblich in ihrer Replikation unterschieden, sollte im Folgenden untersucht werden, ob aviäre Viruspartikel von der Wirtszelle knospen können und im Überstand nachweisbar sind.



**Abb. 3.14: Virusknospung von A549-Zellen und Lungenkulturen.** A549-Zellen (A) bzw. Lungenkulturen (B) wurden mit Pan/99, Dk/Alb oder mock infiziert. 24 h nach der Infektion wurden die Proben für die Elektronenmikroskopie aufgearbeitet. Die Analyse im Elektronenmikroskop erfolgte durch Gudrun Holland (RKI, ZBS4). Maßstab: 500 nm.

Die Knospung der Viren wurde in der Elektronenmikroskopie untersucht. Wie in Abb. 3.14 zu sehen, finden sich sowohl knospende Viren für Pan/99 als auch für Dk/Alb in A549-Zellen (A). Ebenso sind auch in Lungenkulturen (B) abschnürende Viren für beide Virusstämme zu erkennen. Damit sind Virionen des niedrigpathogenen aviären Virus fähig von der Zellmembran zu knospen. Dementsprechend ließen sich auch virale Partikel im Überstand sowohl von Pan/99- als auch Dk/Alb-infizierten A549-Zellen mittels HA-Test und Plaque-test nachweisen (Abb. 3.15 A, B).



**Abb. 3.15: Viruspartikel des aviären Virus zeigen eine deutlich geringere Infektiösität als Partikel des saisonalen Virus.** (A,B) A549-Zellen wurden mit Pan/99 oder Dk/Alb infiziert (moi 2,5) und die Virustiter mittels HA-Test (A) oder Plaque-test auf MDCK-Zellen (B) nach 6 und 24 h ermittelt. (C,D) Lungenkulturen wurden mit Pan/99, Dk/Alb oder Thai/04 infiziert und nach 48 h die Virusmenge im Überstand mittels HA-Test (C) oder Plaque-test auf MDCK-Zellen (D) bestimmt. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils drei (A,C,D) bzw. zwei (B) unabhängigen Experimenten. (E) Verhältnis pfu (infektiöse Partikel) zu HA-bildenden Partikeln (HAP).

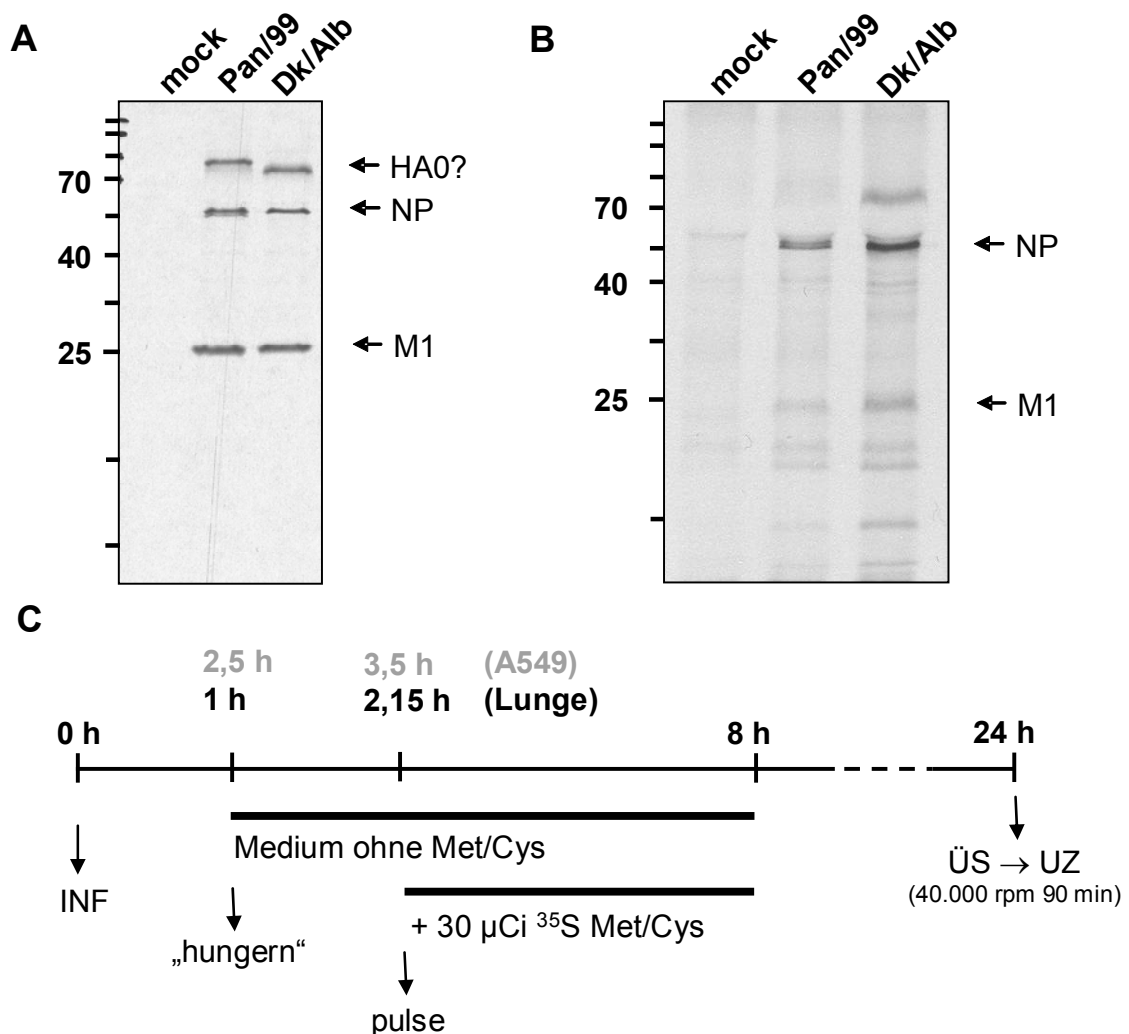


Auffällig ist, dass sich Pan/99 und Dk/Alb hinsichtlich des HA-Titers – also der Anzahl der Viruspartikel – nur um einen Faktor von ungefähr zwei unterscheiden, während sich beide Viren in Bezug auf pfu – also der Anzahl infektiöser Partikel – um das etwa 100fache unterscheiden (Abb. 3.15 A und B). Damit ist der Anteil infektiöser Partikel an der Gesamtanzahl der Viruspartikel bei Dk/Alb deutlich geringer als bei Pan/99 (Abb. 3.15 E). Ein ähnliches Bild ergab sich für die infizierten Lungenkulturen. Wie in Abb. 3.15 C und D dargestellt erreichte das niedrigpathogene aviäre Virus mit dem hochpathogenen H5N1-Virus vergleichbare HA-Titer während das saisonale Virus im HA-Test kaum nachweisbar war. Im Gegensatz dazu erreichten das saisonale und das Thai/04-Virus im Plaquetest auf MDCK-Zellen Titer von  $10^6$  pfu während das niedrigpathogene aviäre Virus nur  $10^4$  pfu und damit einen etwa 100fach niedrigeren Titer erreichte. Damit fanden sich auch in den Lungenkulturüberständen nach Infektion mit Dk/Alb viele Viruspartikel, von denen jedoch nur ein sehr geringer Anteil infektiös war (Abb. 3.15 E).

Um zu untersuchen inwieweit sich die Viruspartikel, die in Lungenkulturen bzw. A549-Zellen produziert wurden, in ihrer Proteinzusammensetzung unterscheiden, wurden „pulse chase“ Experimente durchgeführt.

Dafür wurden A549-Zellen bzw. Lungenkulturen mit einer moi von 5 (A549-Zellen) bzw. mit  $5 \times 10^6$  pfu (Lungenkulturen) infiziert und entsprechend dem in Abb. 3.16 C dargestellten Versuchsablauf mit  $^{35}\text{S}$ -markiertem Methionin und Cystein inkubiert. Sowohl für Pan/99 als auch Dk/Alb ließen sich radioaktiv-markierte virale Proteine, vor allem NP und M1, im Zellkulturüberstand infizierter A549-Zellen und Lungenkulturen nachweisen. Es zeigten sich jedoch keine großen Unterschiede in den Proteinmustern zwischen Pan/99- und Dk/Alb-infizierten A549-Zellen (Abb. 3.16 A) und Lungenkulturen (Abb. 3.16 B).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Viruspartikel nach Infektion mit dem niedrigpathogenen aviären Virus im Überstand nachweisbar sind. Diese unterscheiden sich deutlich von Partikeln eines saisonalen Virus hinsichtlich ihrer Infektiösität, jedoch kaum hinsichtlich ihrer Proteinzusammensetzung.

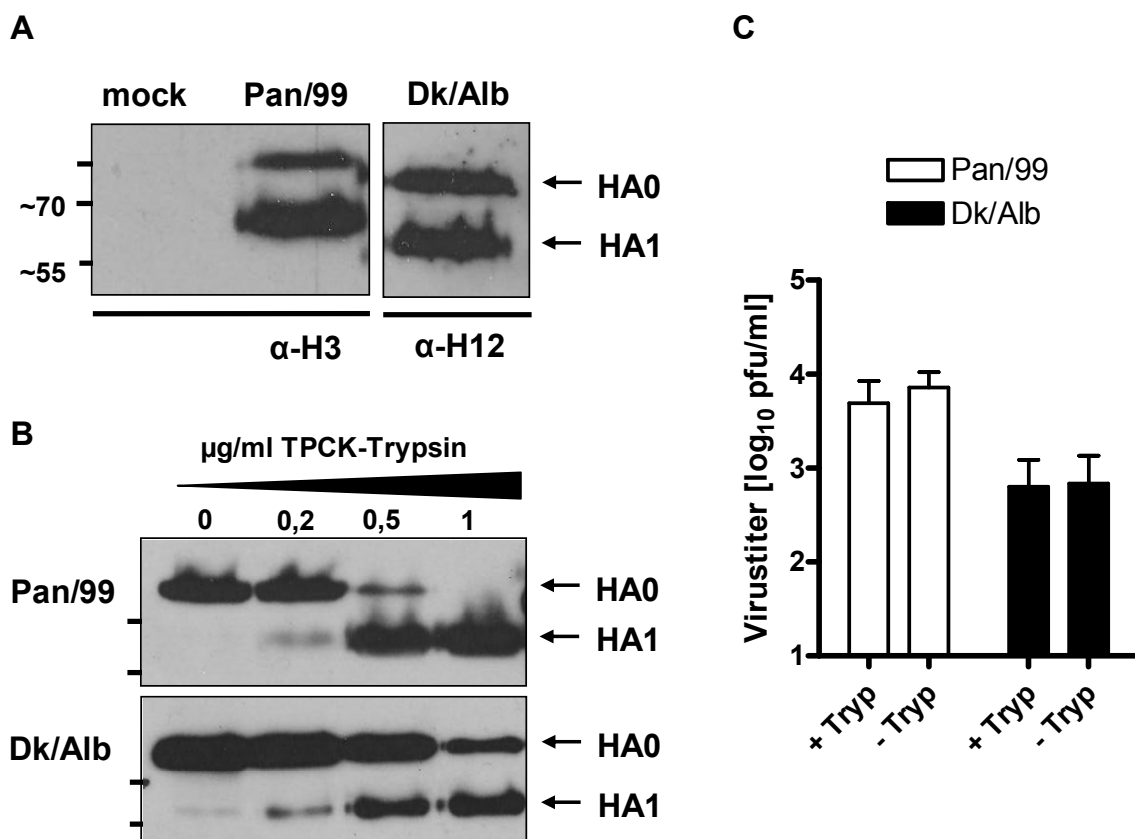


**Abb. 3.16: Nachweis viraler Proteine im Überstand infizierter A549-Zellen bzw. Lungenkulturen.** A549-Zellen (A) und Lungenkulturen (B) wurden infiziert (moi 5 bzw.  $5 \times 10^6$  pfu), anschließend das Medium auf „Hungermedium“ (ohne Met/Cys) gewechselt und radioaktivmarkiertes Methionin und Cystein hinzugefügt. 8 h nach der Infektion wurde das Medium abgenommen und durch Infektionsmedium ersetzt. Der Überstand wurde nach 24 h präzipitiert, über ein SDS-Gel aufgetrennt und mittels Autoradiographie detektiert. (C) Schematische Übersicht des Experimentes.

### 3.6 Werden HA-Proteine in Virionen des niedrigpathogenen aviären Virus in humanen Lungenkulturen gespalten?

Das zunächst als HA0-Vorläuferprotein gebildete HA muss, um seine volle Fusionsaktivität und die damit verbundene Infektiösität der Virionen zu erhalten, in HA1 und HA2 gespalten werden. Die Spaltung des HAs erfolgt durch im Respirationstrakt exprimierte trypsinähnliche Proteasen oder in Zellkultur durch zugefügtes Trypsin. In Abschnitt 3.1 (Abb. 3.3) konnte bereits gezeigt werden, dass im Lungenmodell das HA des saisonalen Virus gespalten wird und

die Virionen somit infektiös sind. Um zu untersuchen, ob die niedrige Infektiosität der aviären Virionen (Abb. 3.15 E) im Lungenmodell mit nicht ausreichend gespaltenem HA korreliert, wurden aviäre Virionen auf das Vorhandensein gespaltenen HAs untersucht. Dazu wurden Lungenkulturen mit  $5 \times 10^6$  pfu des aviären (Dk/Alb) oder des saisonalen (Pan/99) Virus infiziert und die aus dem Überstand aufgereinigten Virionen mittels Westernblotanalyse hinsichtlich des Prozessierungszustandes des HA-Proteins untersucht. Es zeigte sich, dass sowohl in Virionen des saisonalen Virus (Pan/99) als auch in Virionen des aviären Virus (Dk/Alb) gespaltenes HA1 nachzuweisen war (Abb. 3.17).



**Abb. 3.17: Nachweis von gespaltenem HA in Virionen.** (A) Humane Lungenkulturen wurden mit den Viren Pan/99 und Dk/Alb infiziert ( $5 \times 10^6$  pfu) und nach 24 h die Virionen im Überstand durch Ultrazentrifugation aufgereinigt. Der Nachweis des HA-Vorläuferproteins HA0 und des Spaltproduktes HA1 in Virionen erfolgte in der Westernblotanalyse unter Verwendung H3- und H12-spezifischer Antikörper. (B) Spaltbarkeit der HA-Proteine durch TPCK-Trypsin. 3620 HAU/ml eines HA0-Virusstocks (MDCK-Überstand) mit ungespaltenem HA-Protein wurden mit den angegebenen Mengen TPCK-Trypsin 1 h bei 37°C inkubiert, die Virionen mittels Ultrazentrifugation aufgereinigt und mittels SDS-PAGE und Westernblotanalyse auf gespaltenes HA untersucht. (C) Nachspaltung der Lungenüberstände mit TPCK-Trypsin. Überstände infizierter Lungen ( $4 \times 10^5$  pfu, 24 h p. i.) wurden entweder mit oder ohne 10 µg/ml TPCK-Trypsin für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend die Menge infektiöser Partikel mittels Plaquetest bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei verschiedenen Patientenproben.

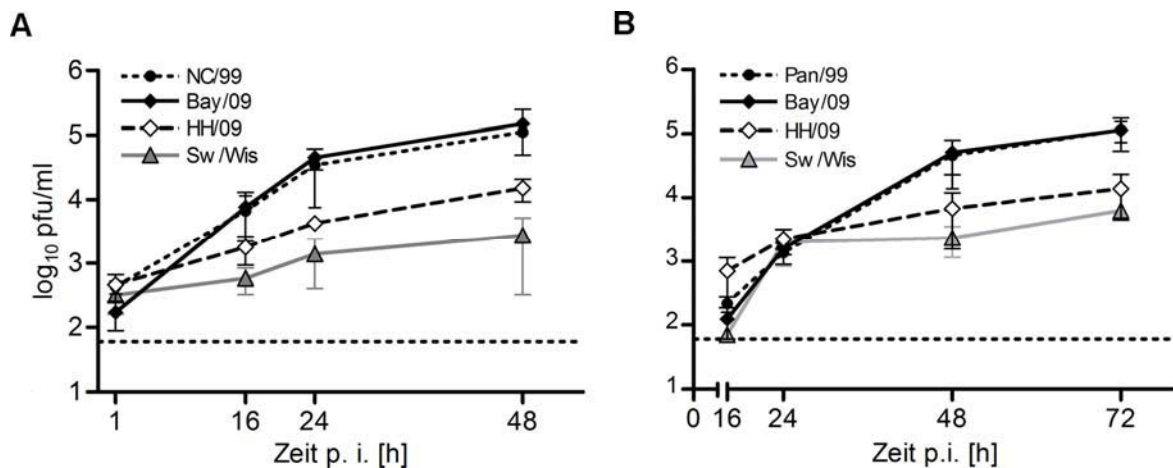


Auch wenn das aviäre HA nicht komplett gespalten wird, sollte das vorhandene HA1 für die Infektiösität der Viruspartikel ausreichen. Um dies zu bestätigen, wurden Überstände infizierter Lungenkulturen mit TPCK-Trypsin behandelt, um nicht gespaltenes HA nachzuspalten und anschließend die Infektiösität der Virionen im Plaquetest untersucht. Wie in Abb. 3.17 C dargestellt, zeigen sich keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Proben. Da auch in den Überständen von Dk/Alb-infizierten A549-Zellen der Anteil der nichtinfektiösen Virionen sehr groß war (Abb. 3.15 E), wurde zudem die Spaltbarkeit des aviären HAs durch TPCK-Trypsin untersucht (Abb. 3.17 B). Auch hier zeigte sich, dass sich das aviäre HA gut von TPCK-Trypsin spalten lässt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das aviäre HA sowohl durch TPCK-Trypsin als auch durch eine im Lungenkulturmodell vorhandene Protease gespalten wird. Damit lässt sich die geringe Infektiösität der Virionen im Überstand Dk/Alb-infizierter Lungen- und Zellkulturen nicht durch ein unzureichend gespaltenes aviäre HA-Protein erklären.

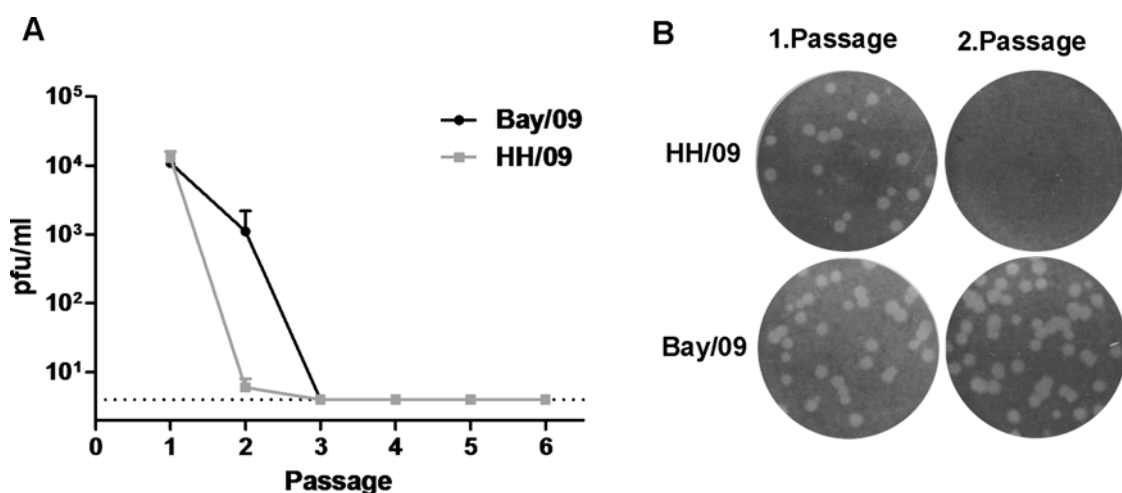
### **3.7 Replikation der pandemischen H1N1-Viren 2009**

Mit dem Auftreten der H1N1 Pandemie 2009 wurden zwei verschiedene Patientenisolate im Lungenmodell und den primären Zellen untersucht. Beide Isolate (Bay/09 und HH/09) replizierten in primären NHBE-Zellen sowie humanen Lungenkulturen effizienter als ein klassisches Schweinevirus (Sw/Wis). Auffällig ist, dass beide Isolate zu leicht unterschiedlichen Titern replizierten. Während sich Bay/09 mit Titern von über  $10^5$  pfu im Lungenmodell vergleichbar zu einem saisonalen Virus verhielt, erreichte HH/09 Titer die etwa eine Logstufe tiefer lagen (Abb. 3.18).



**Abb. 3.18: Vermehrung saisonaler und pandemischen Influenzaviren in NHBE-Zellen (A) und Lungenkulturen (B).** NHBE-Zellen und Lungenkulturen wurden mit den verschiedenen Virusstämmen infiziert (moi 0,01 bzw.  $4 \times 10^5$  pfu) und die Virusmenge im Überstand nach der angegebenen Zeit mittels Plaquetest auf MDCK-Zellen bestimmt. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  SEM von Duplikaten aus zwei unabhängigen Experimenten (A) bzw. von Triplikaten aus drei unabhängigen Experimenten (B).

Da das pandemische HH/09-Virus ineffizienter als das pandemische Bay/09-Virus und beide Viren nicht zu so hohen Titern wie das H5N1-Virus replizierten (vergleiche Abb. 3.9), wurde versucht durch mehrfaches Passagieren der Viren in den Lungenkulturen die Replikationseffizienz zu steigern. Die nähere Untersuchung solcher adaptiven Virusvarianten könnte Aufschluss über mögliche weitere Virulenzmarker der pandemischen Viren geben.



**Abb. 3.19: Passagieren der pandemischen H1N1-Viren in Lungenkulturen.** Je zwei Lungenkulturen wurden mit den pandemischen Viren Bay/09 oder HH/09 infiziert, nach 24 h die Überstände abgenommen und unverdünnt zur Infektion weiterer Lungenkulturen verwendet. Die Virusmenge in den Überständen wurden mittels Plaquetest auf MDCK-Zellen für die einzelnen Passagen bestimmt (A). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  SEM der zwei infizierten Lungenkulturen. (B) Plaquemorphologie der Passagen 1 und 2 auf MDCK-Zellen.

Wie in Abb. 3.19 dargestellt, war es jedoch nicht möglich adaptive Virusvarianten zu erzeugen. Nach zwei Passagen war der Virustiter so gering, dass es nicht mehr zu einer erfolgreichen Infektion kam und kein Virus mehr im Überstand nachgewiesen werden konnte. Auch ließ sich in den Passagen 1 und 2 keine Veränderung der Plaquegrößen feststellen (Abb. 3.19 B).

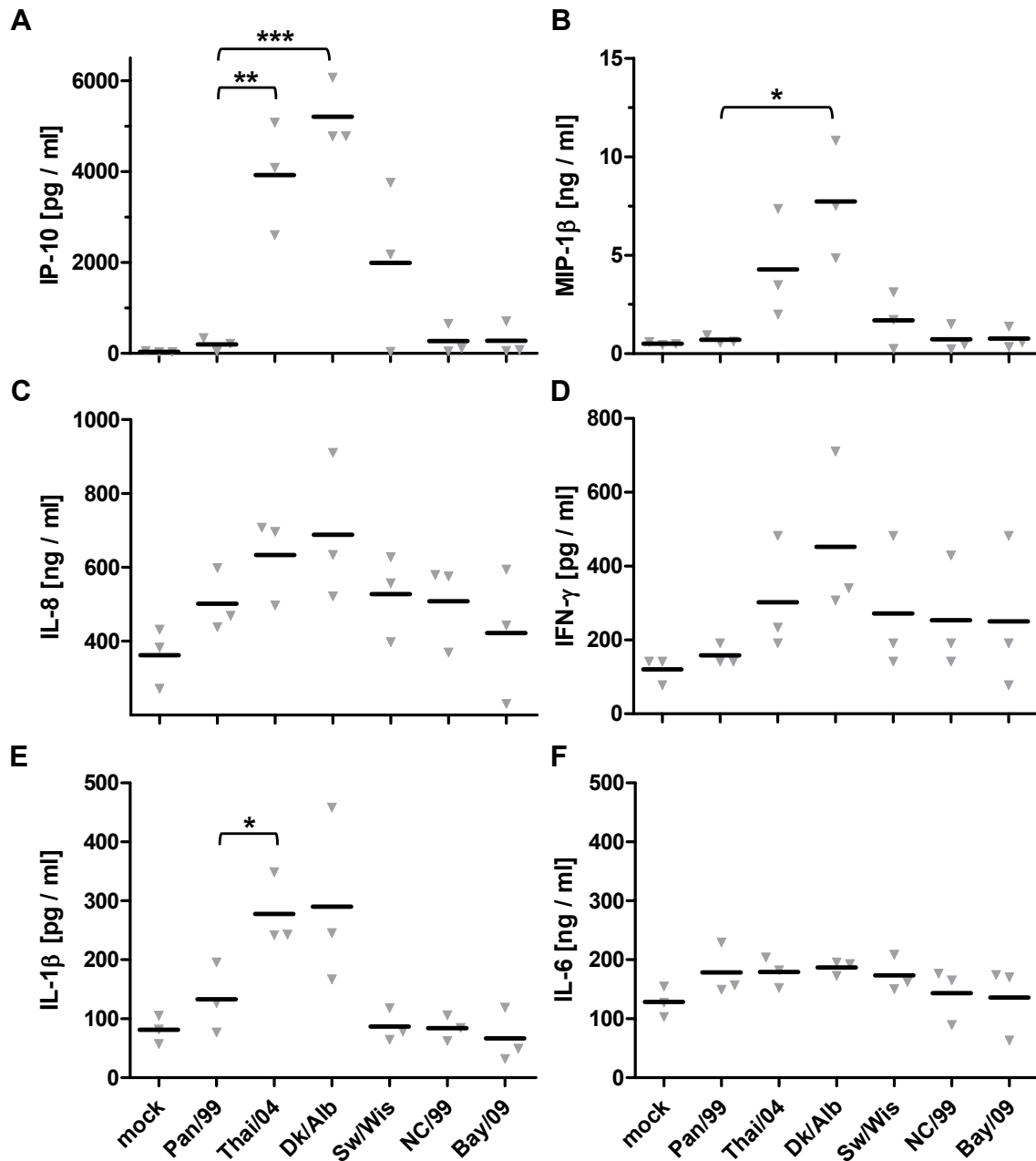
### **3.8 Cytokininduktion aviärer, porziner und humanpathogener Influenzaviren**

Während einer Virusinfektion kommt es im Wirt zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Saisonale Influenzaviren können mit Hilfe ihres NS1-Proteins Teilbereiche des angeborenen Immunsystems wie z. B. die Ausschüttung bestimmter Cytokine inhibieren und damit eine effektive Replikation im Wirt erreichen. Um zu untersuchen, ob aviäre und porcine Influenzaviren ebenfalls in der Lage sind, Teile der angeborenen Immunantwort zu inhibieren, wurde die Induktion von Chemokinen, Interleukinen und Typ I Interferonen nach Infektion mit den verschiedenen Virusstämmen untersucht.

#### **3.8.1 Induktion von Chemokinen, Interleukinen und Typ II Interferonen durch die verschiedenen Virusstämme**

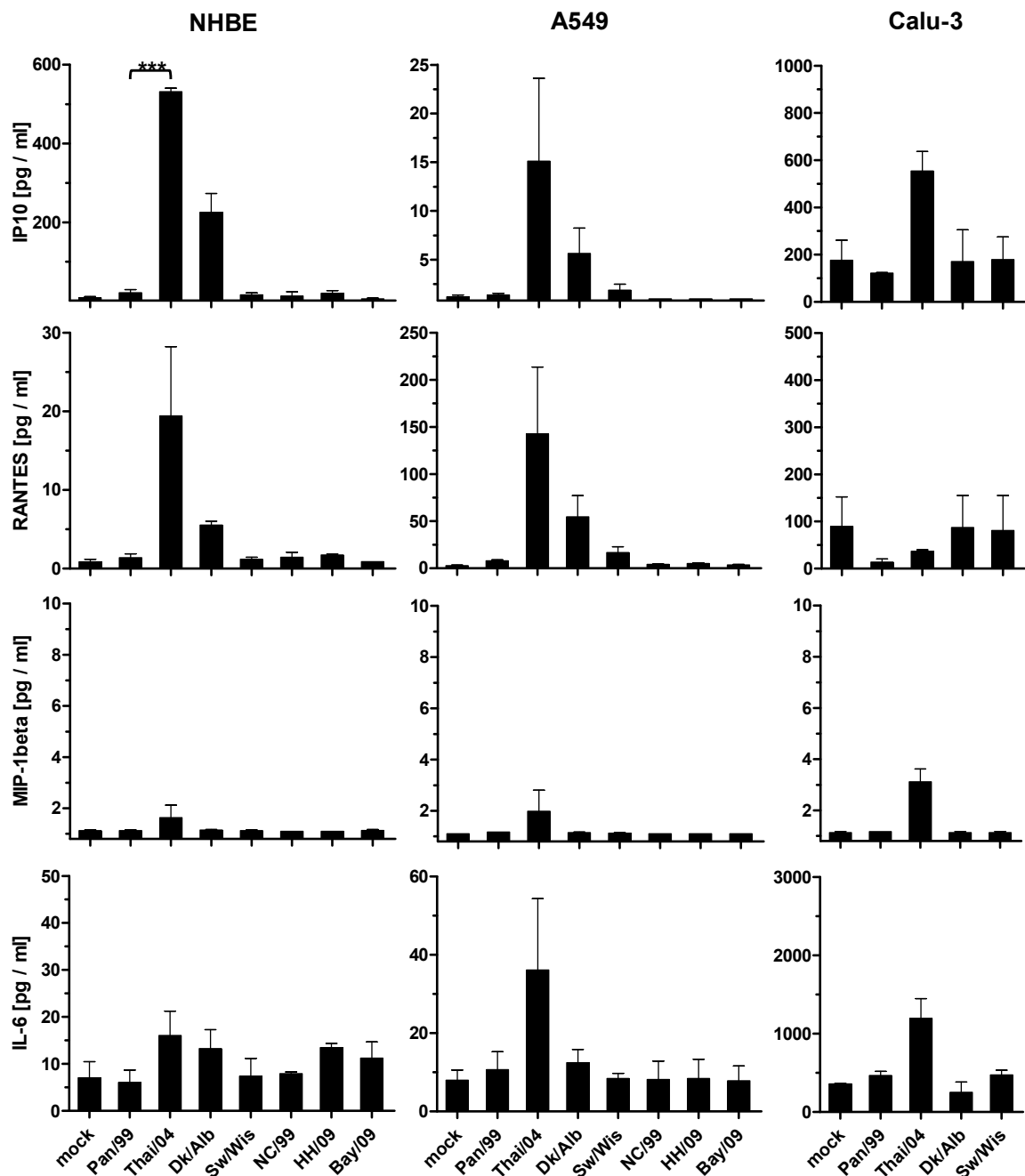
Zur Untersuchung der induzierten Chemokine IP-10, MIP-1 $\beta$ , RANTES und IL-8, der Interleukine IL-1 $\beta$  und IL-6 und des Typ II Interferons IFN- $\gamma$  nach Virusinfektion wurden A549-, Calu-3-, NHBE-Zellen und humane Lungenkulturen mit humanpathogenen, aviären und porcinen Viren infiziert. 24 h nach der Infektion wurde die sekretierte Cytokinmenge im Überstand der Zellen mittels Multiplex-Cytokinassay und ELISA bestimmt. In den Lungenkulturen ließ sich für das hochpathogene H5N1-Virus (Thai/04) eine deutliche Induktion von IP-10, MIP-1 $\beta$  und IL-1 $\beta$  und eine leichte Induktion von IL-8 und IFN- $\gamma$  feststellen. Im Vergleich dazu führte die Infektion mit dem saisonalen Virus (Pan/99) nur zu einer geringen Induktion der entsprechenden Cytokine (Abb. 3.20). Auffallend ist, dass das niedrigpathogene aviäre Virus (Dk/Alb) im Lungengewebe eine mit dem Thai/04-Virus vergleichbar hohe oder sogar vermehrte Induktion von IP-10, MIP-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 und IFN- $\gamma$  hervorrief, die in Zellkulturen nicht erkennbar war. In Zellkulturen zeigte das aviäre Virus (Dk/Alb) für

IP-10 zwar eine im Vergleich zum saisonalen Virus (Pan/99) vermehrte Induktion, diese war jedoch um das dreifache geringer als für das hochpathogene H5N1-Virus (Thai/04; Abb. 3.21). MIP-1 $\beta$  und IL-1 $\beta$  ließen sich in den Zellkulturen kaum nachweisen. Die pandemischen H1N1-Viren führten weder in den



**Abb. 3.20: Differenzielle Cytokin- und Chemokinsekretion durch aviäre, porcine, saisonale und pandemische Influenzaviren in humanen Lungenkulturen.** Humane Lungenkulturen wurden mit den angegebenen Viren infiziert und die Cytokin-/Chemokinmenge im Überstand nach 24 h mittels Multiplex-Cytokinassay oder ELISA bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte (Striche) und Einzelwerte von drei unabhängigen Experimenten (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; student's t-test).

Zellkulturen noch im Lungengewebe zu einer starken Cytokinantwort (Abb. 3.20, Abb. 3.21). Dagegen führte die Infektion mit dem porzinen Stamm (Sw/Wis) im Lungenmodell zu einer deutlichen Induktion von IP-10 und zu einer leichten MIP-1 $\beta$ -Induktion (Abb. 3.20).

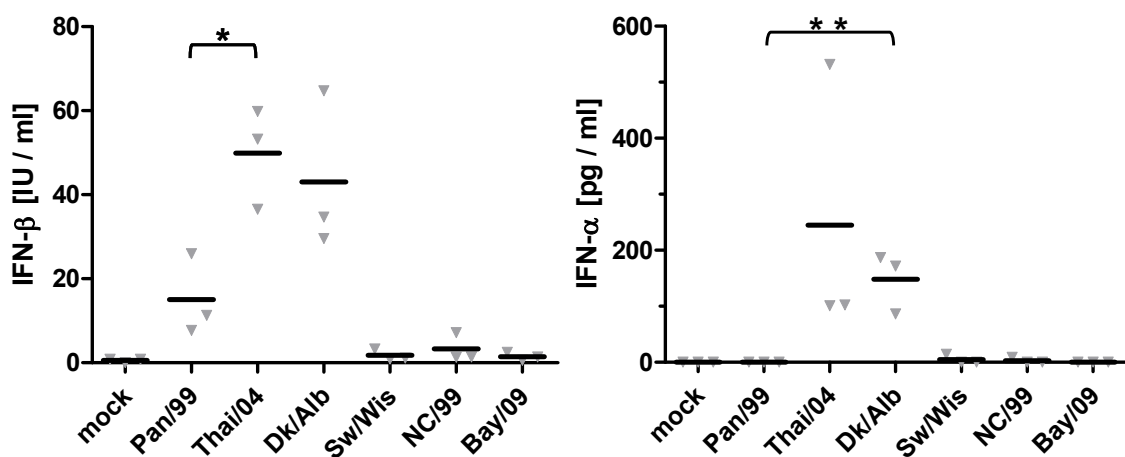


**Abb. 3.21: Differenzielle Cytokininduktion aviärer, porziner, saisonaler und pandemischer Influenzaviren in NHBE-, A549- und Calu-3-Zellen.** NHBE-, A549- und Calu-3-Zellen wurden mit den angegebenen Viren infiziert (moi 0,01) und die Cytokinkonzentration im Überstand 24 h p. i. mittels Multiplex-Cytokinassay bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei (NHBE, A549) bzw. zwei (Calu-3) unabhängigen Experimenten (\*\*\*p<0,001; student's t-test).

Eine deutliche Induktion des Chemokins RANTES ließ sich nur auf A549- und NHBE-Zellen feststellen. Hier führten sowohl Thai/04- als auch Dk/Alb-Viren zu einer erhöhten Induktion im Vergleich zur Infektion mit Pan/99-Viren (Abb. 3.21). In den Überständen infizierter Lungen war RANTES dagegen kaum nachweisbar (nicht dargestellt). Das Chemokin IL-8 und das Interleukin IL-6 waren deutlich zu detektieren. Hier zeigte sich für IL-8 auf den Lungenkulturen eine sehr geringe Erhöhung bei Infektion mit Thai/04- und Dk/Alb-Viren und für IL-6 eine leichte Induktion bei Infektion mit den Thai/04-Viren auf A549 und Calu-3-Zellen, die auf der Lunge nicht zu erkennen waren (Abb. 3.20, Abb. 3.21).

### 3.8.2 Induktion von Typ I Interferonen durch die verschiedenen Virusstämme

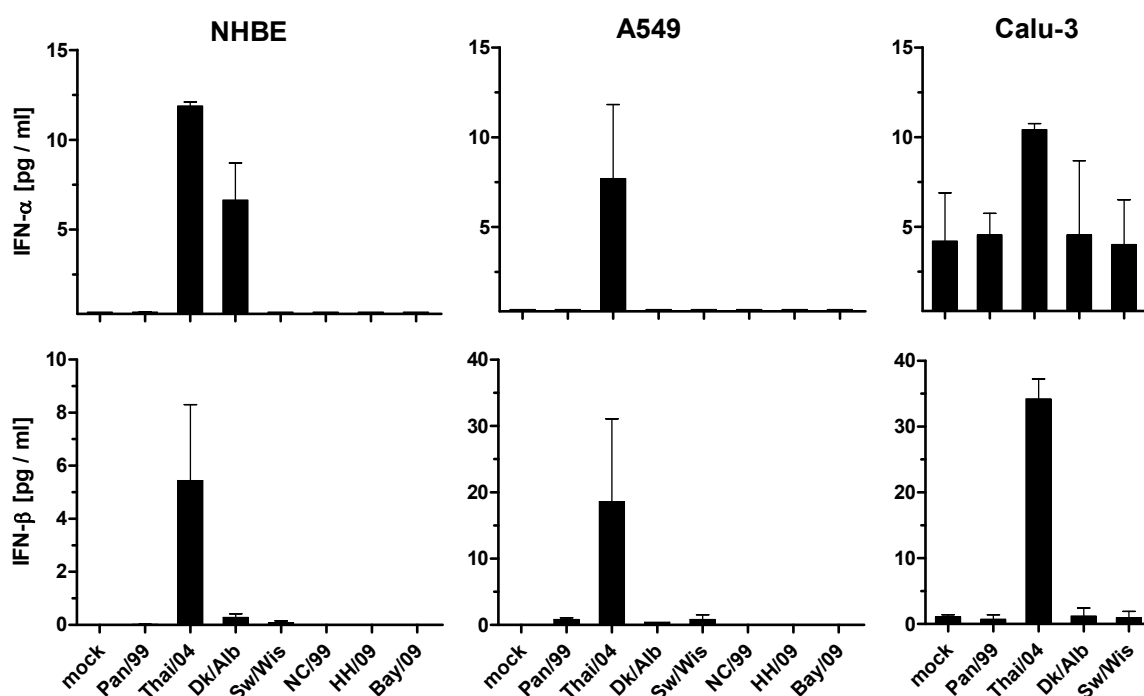
Für die im Überstand der Zellen und Lungenkulturen gemessenen Typ I IFNe ergab sich ein ähnliches Bild wie für die zuvor beschriebenen Chemokine und Interleukine.



**Abb. 3.22: Differenzielle Typ I Interferoninduktion durch aviäre, porcine, saisonale und pandemische Influenzaviren in humanen Lungenkulturen.** Humane Lungenkulturen wurden mit den angegebenen Viren infiziert und die Cytokin-/Chemokinmenge im Überstand nach 48 h mittels ELISA bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte (Striche) und Einzelwerte von drei unabhängigen Experimenten (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; student's t-test).

Das hochpathogene H5N1-Virus führte zu einer vermehrten IFN-Induktion in Zell- und Lungenkulturen. Das niedrigpathogene aviäre Virus (Dk/Alb) induzierte dagegen nur im Lungengewebe deutlich IFN-α und IFN-β; erstgenanntes wurde auch in primären NHBEs induziert. Pandemische H1N1-Viren und

das porcine Virus führten zu einer mit saisonalen Viren vergleichbar geringen Induktion von Typ I IFN (Abb. 3.22, Abb. 3.23).

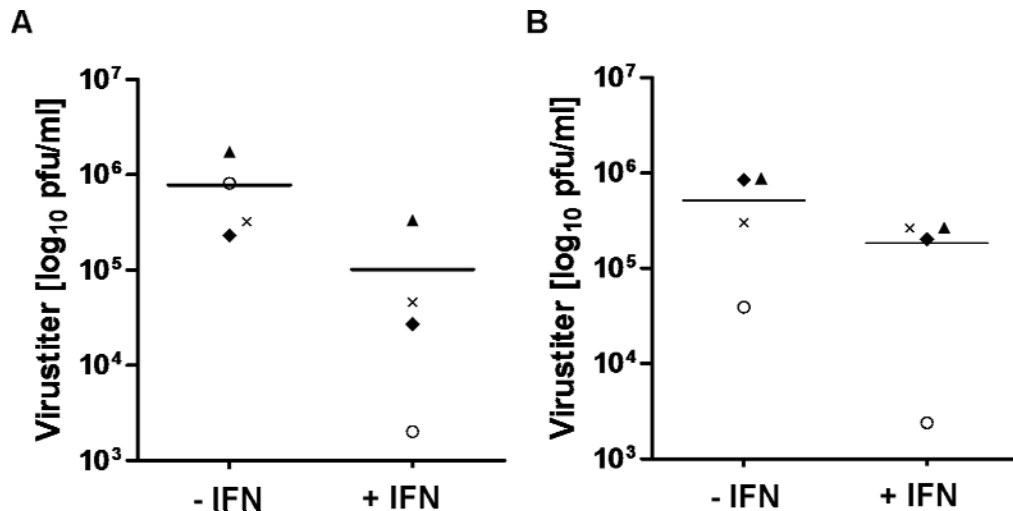


**Abb. 3.23: Differenzielle Typ I Interferoninduktion aviärer, porciner, saisonaler und pandemischer Influenzaviren in NHBE-, A549- und Calu-3-Zellen.** NHBE-, A549- und Calu-3-Zellen wurden mit den angegebenen Viren infiziert (moi 0,01) und die Cytokinkonzentration im Überstand 24 h p. i. mittels Multiplex-Cytokinassay bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei (NHBE, A549) bzw. zwei (Calu-3) unabhängigen Experimenten.

Da die hochpathogenen H5N1-Viren in den Lungenkulturen stark IFN induzierten, welches eigentlich die Virusreplikation inhibiert, sie aber dennoch sehr effizient replizierten, wurde untersucht, ob die Replikation der H5N1-Viren im Gegensatz zu saisonalen Viren unabhängig von vorhandenem IFN ist. Hierzu wurden Lungenkulturen mit rekombinantem IFN- $\alpha$  6 h inkubiert und anschließend entweder mit Thai/04 oder Pan/99 infiziert. In Abb. 3.24 ist die Virusmenge im Überstand 24 h nach der Infektion dargestellt. Während die Vermehrungsfähigkeit des saisonalen Virus (Pan/99) nach IFN-Vorbehandlung im Vergleich zu nicht vorbehandelten Zellen deutlich abnahm, zeigte sich für die mit Thai/04 infizierten Proben nur eine leichte Reduktion der Replikation nach Vorbehandlung.

Zusammenfassend induzierte das hochpathogene H5N1-Virus eine sehr starke Cytokinantwort in Zell- und Lungenkulturen während die pandemischen H1N1-Viren von 2009 mit dem saisonalen Virus vergleichbar geringe Mengen an Cy-

tokinen induzierten. Ebenso zeigte das niedrigpathogen aviäre Virus auf den Lungenkulturen eine starke Cytokininduktion, die jedoch auf den Zellkulturen nicht zu beobachten war.



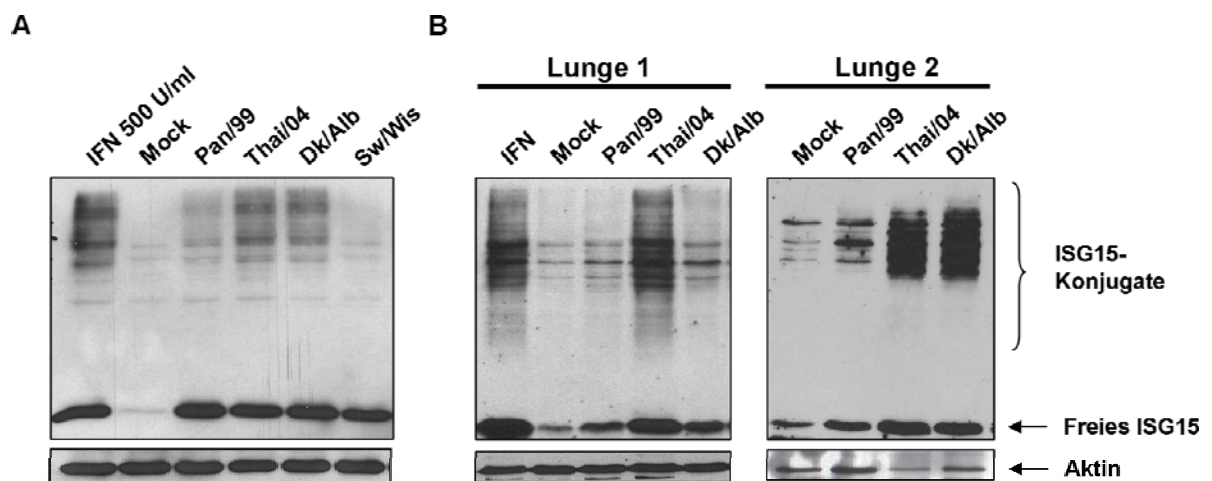
**Abb. 3.24: Replikation saisonaler (A) und H5N1 (B) Influenzaviren mit und ohne IFN-Vorbehandlung.** Lungenkulturen wurden für 6 h mit 500 U IFN- $\alpha$  (+IFN) bzw. ohne IFN (-IFN) inkubiert, anschließend mit Pan/99 (A) oder Thai/04 (B) infiziert und die Virusmenge im Überstand 24 h p. i. mittels Plaquetest auf MDCK-Zellen bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte (Striche) und Einzelwerte von vier unabhängigen Experimenten. Gleiche Symbole stehen für Proben eines Patienten.

### 3.8.3 Nachweis der interferoninduzierten Proteine ISG15 und MxA

Sekretiertes IFN- $\alpha/\beta$  führt über die Bindung an den IFN- $\alpha/\beta$ -Rezeptor (IFNAR) zur Induktion der Expression der antiviral wirkenden interferonstimulierten Gene (ISG). Da bisher noch nicht bekannt ist, ob solche komplexen Signalwege der nichtadaptiven Immunität auch in den hier verwendeten Lungenkulturen untersucht werden können, wurde im Folgenden die Induktion des ISGs ISG15 näher betrachtet. Nach der Induktion und Expression wird freies ISG15 in einer komplexen Enzymkaskade an über 150 verschiedene Zielproteine gebunden. Für diese Kaskade müssen mindestens drei Konjugationsenzyme (E1, E2 und E3) vorhanden sein, die ebenfalls durch Typ I IFN induziert werden. Wie in Abb. 3.25 dargestellt, konnte nach IFN-Behandlung sowohl eine deutliche ISG15-Induktion als auch eine vermehrte ISG15-Konjugation in den Lungenkulturen beobachtet werden. Auch nach Infektion mit dem Thai/04-Virus zeigte sich eine vermehrte Induktion von ISG15 und dessen Konjugate, die



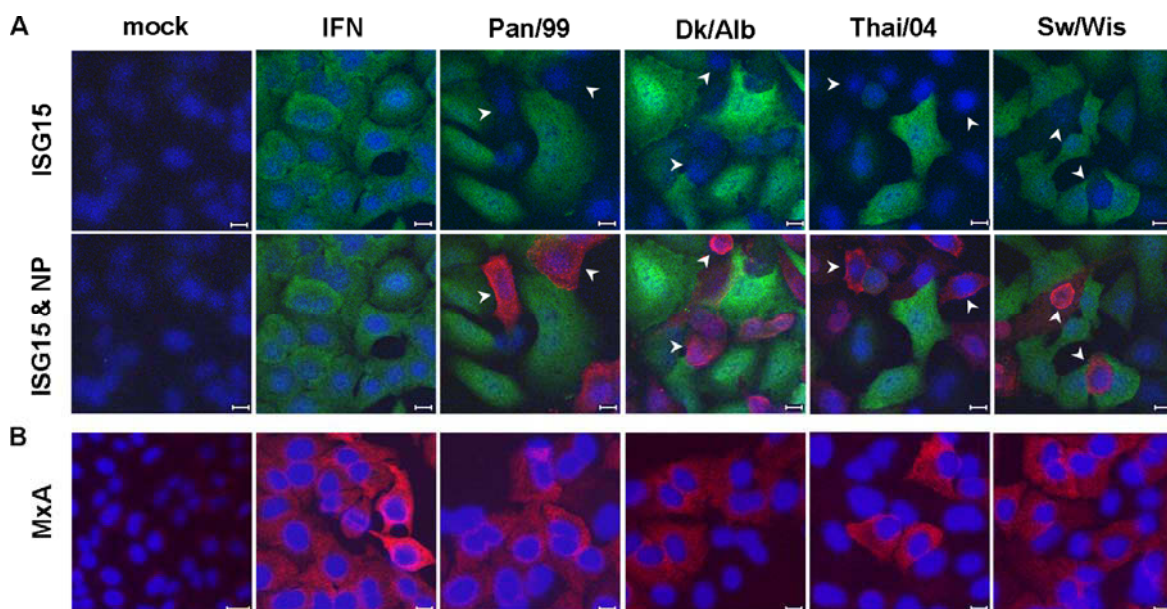
mit der beobachteten hohen Typ I IFN-Induktion korrelierte. Im Vergleich dazu kam es nach Infektion mit dem saisonalen Virus (Pan/99) zu einer deutlich geringeren Induktion und ISGylierung, was gut mit der gemessenen geringen IFN-Menge im Lungenüberstand im Einklang steht. Für das Virus Dk/Alb ergab sich kein einheitliches Bild. Während es in Lunge 1 ISG15 nur schwach induzierte, fanden sich bei Lunge 2 deutlich ISG15 und ISG15-Konjugate. Vergleichende Analysen auf pneumozytenähnlichen A549-Zellen zeigten eine deutliche Induktion von ISG15 sowohl nach IFN-Behandlung als auch nach Infektion mit den verschiedenen Viren. Auffällig ist, dass die Induktion von ISG15 nach Infektion mit dem Thai/04-Virus trotz einer vermehrten IFN-Antwort (Abb. 3.23) vergleichbar mit einer Infektion mit dem Pan/99-Virus war. Im Gegensatz zu den Lungenkulturen ließen sich hier also keine großen Unterschiede zwischen den verschiedenen Virusstämmen zeigen. Lediglich in Bezug auf die ISGylierung ließen sich leichte Unterschiede feststellen. So führte die Infektion mit Thai/04 und Dk/Alb zu einer im Vergleich zu Pan/99 leicht vermehrten ISGylierung wie sie auch im Lungenmodell zu beobachten war.



**Abb. 3.25: Nachweis von freiem und konjugiertem ISG15 nach Infektion von A549-Zellen (A) bzw. Lungenkulturen (B).** A549-Zellen bzw. Lungenkulturen wurden mit den angegebenen Viren infiziert (moi 1 bzw.  $4 \times 10^5$  pfu). 24h p. i. wurden Lysate hergestellt, diese mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mittels eines polyklonalen Kaninchenserum freies und konjugiertes ISG15 detektiert.

Die Expression von ISG15 und MxA, als ein weiteres IFN-induziertes Gen, wurde in A549 Zellen mittels Immunfluoreszenz weiter untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl für die aviären als auch die saisonalen und hochpathogenen Viren neben ISG15 auch MxA nach Infektion in der Immunfluoreszenz nach-

weisbar war (Abb. 3.26). Auffällig ist, dass die ISG15-Fluoreszenz in NP-positiven Zellen (Abb. 3.26A, Pfeilspitzen), deutlich niedriger war als in umliegenden nicht infizierten Zellen. Um dies zu quantifizieren, wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für ISG15 mit Hilfe von FACS-Analysen bestimmt. Hierbei zeigten sich für alle Viren vergleichbare MFI für ISG15, wobei die MFI für das Thai/04-Virus etwas niedriger als für das saisonale Virus (Pan/99) war. Wie in Abb. 3.27 dargestellt, ließen sich im „dot blot“ (NP-Fluoreszenz versus ISG15-Fluoreszenz) deutlich zwei Zellpopulationen erkennen, eine die ein starkes NP-Signal aufweist und damit deutlich infiziert war (Population 1) und eine, die relativ negativ für NP ist und damit nicht oder nur sehr schwach infiziert war (Population 2).

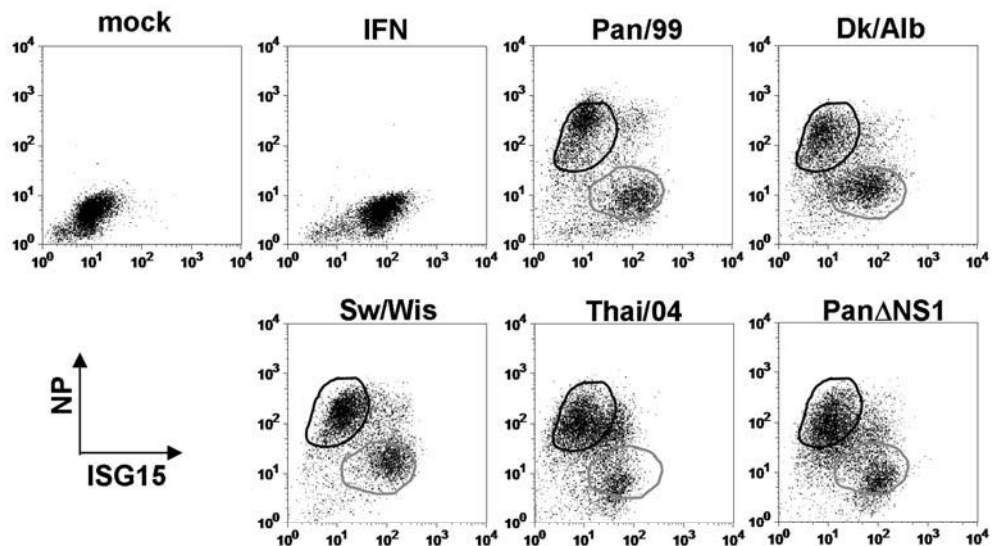


**Abb. 3.26: Nachweis der interferoninduzierten Proteine ISG15 und MxA.** A549-Zellen wurden mit den angegebenen Viren infiziert (moi 1). 20 h p. i. wurden die Zellen fixiert und mittels indirekter Immunfluoreszenzanalyse die Proteine ISG15 (grün A) und NP (rot A) bzw. MxA (rot, B) dargestellt. Maßstab 10 µm.

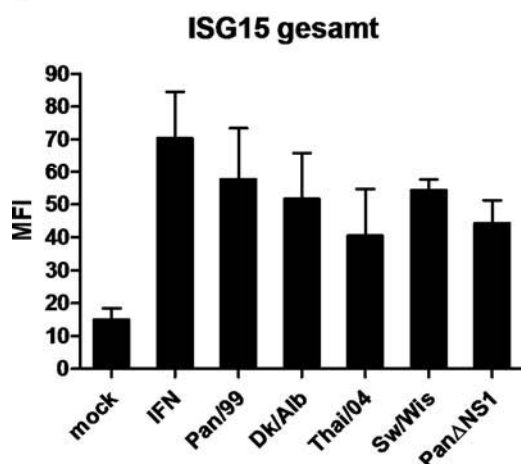
Vergleicht man die zwei Populationen hinsichtlich ihrer MFI für ISG15 lassen sich signifikante Unterschiede zwischen den Populationen erkennen. In Zellen, die starke NP-Signale hatten und daher infiziert waren, war kaum ISG15 nachweisbar, während ISG15 in schwach oder nicht infizierten Zellen deutlich exprimiert wurde. Dieser Effekt ist unabhängig von dem Vorhandensein des viralen NS1, da er auch bei einer Infektion mit einem Virus ohne NS1 (PanΔNS1) zu beobachten war. Zudem lässt sich dieses Phänomen für alle verwendeten Virusstämme beobachten, so dass keine Unterschiede zwischen

den verschiedenen Virusstämmen bezüglich der Induktion von ISG15 feststellbar waren.

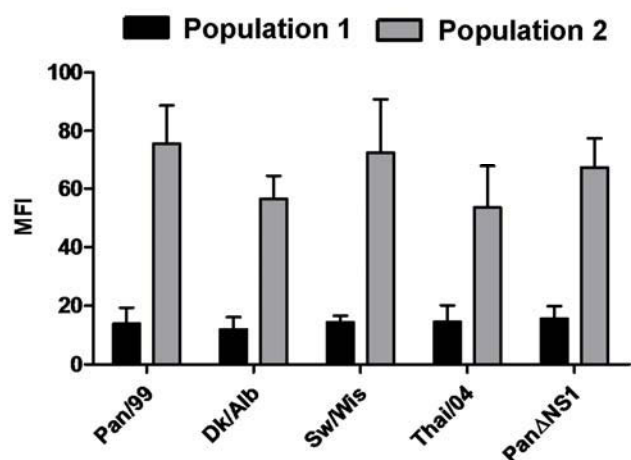
**A**



**B**



**C**



**Abb. 3.27: ISG15-Expression in infizierten A549-Zellen.** A549-Zellen wurden mit den angegebenen Virusstämmen infiziert (moi 1), nach 20 h fixiert und die Expression von ISG15 und NP mittels indirekter FACS-Analyse nachgewiesen. Dargestellt sind jeweils repräsentative „dot blots“ (A), die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von ISG15 gesamt (B) und die MFI von ISG15 aufgeteilt nach Populationen 1 und 2 (C). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von zwei bis drei unabhängigen Experimenten.

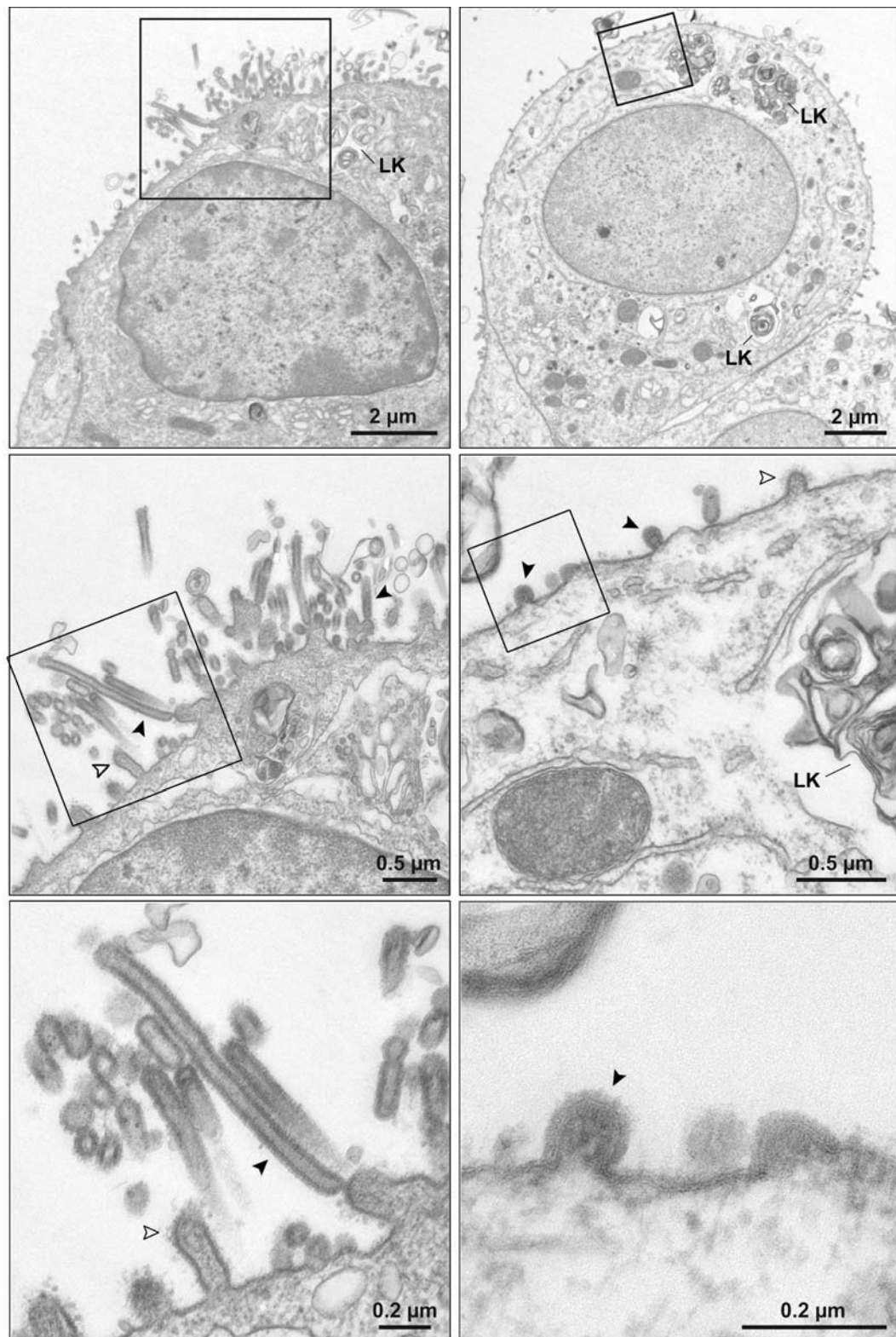
Zusammenfassend induzierten in A549-Zellen alle untersuchten Viren ISG15 und dessen Konjugate, wobei letztere in Thai/04-infizierten Zellen etwas stärker als in Pan/99-infizierten Zellen nachzuweisen waren. In mit Thai/04-

infizierten Lungenkulturen konnte deutlich sowohl mehr freies als auch konjugiertes ISG15 als in Pan/99-infizierten Kulturen nachgewiesen werden.

### **3.9 Zelltropismus aviärer und humanpathogener Influenzaviren in humanen Lungenkulturen**

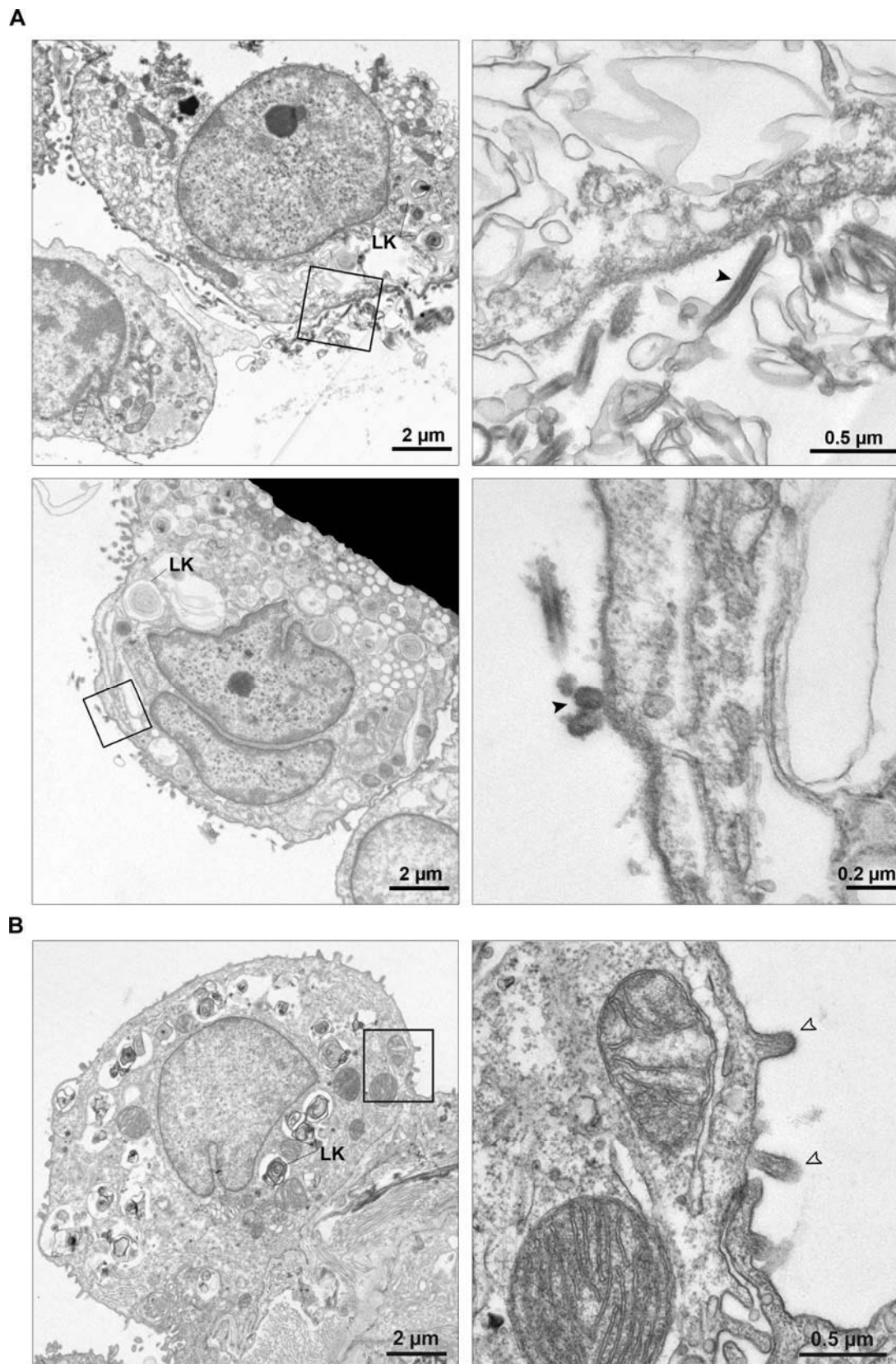
Influenzaviren treffen in den Alveolen der Lunge auf verschiedene Zelltypen und es konnte bereits gezeigt werden, dass aviäre H5N1-Viren vor allem Typ II Pneumozyten infizieren (Baskin *et al.* 2009, Korteweg und Gu 2008). Dagegen zeigten Bindungsstudien für saisonale Influenzaviren eine vermehrte Bindung an Typ I Pneumozyten (van Riel *et al.* 2007). Da Unterschiede im Zelltropismus z. B. aufgrund unterschiedlicher Stoffwechselaktivitäten infizierter Zelltypen entscheidend zur Replikationsfähigkeit der Viren und Pathogenese beitragen könnten, wurde im Folgenden der Zelltropismus aviärer und saisonaler Viren in humanen Lungenkulturen näher untersucht. Dazu wurden elektronenmikroskopische und immunhistochemische Analysen durchgeführt, wobei letztere durch unsere Kooperationspartner Anne Becher, Andreas Hocke und Stefan Hippenstiel von der Medizinischen Klinik m. S. Infektiologie und Pneumologie der Charité ausgeführt wurden.

Wie in Abb. 3.28 und Abb. 3.29 dargestellt, ließen sich in der elektronenmikroskopischen Analyse knospende Viren oder mit Alveolarzellen assoziierte Viren (schwarze Pfeilspitze) nachweisen, die sich deutlich von zellulären Mikrovilli (offene Pfeilspitze) unterscheiden ließen. Interessanterweise ließen sich keine Unterschiede im Zelltropismus des saisonalen H3N2-Virus (Abb. 3.28) und des niedrigpathogenen aviären Dk/Alb-Virus (Abb. 3.29) feststellen. Für beide Viren erfolgte das Abknospen meist von Alveolarzellen, die durch das Vorhandensein von Lamellarkörperchen (LK) morphologisch als Typ II Pneumozyten identifiziert werden konnten. Dagegen ließ sich keine Abknospung der Viren von Typ I Zellen beobachten. Diese Ergebnisse konnten durch unsere Kooperationspartner über immunhistologische Doppelfärbungen des viralen Proteins mit dem proSurfactantprotein C (proSP-C) als spezifischen Typ II Pneumozytenmarker bestätigt werden (Anhang I). Des Weiteren konnten sie zeigen, dass auch das hochpathogene H5N1-Virus und die pandemischen H1N1-Viren präferentiell Typ II Pneumozyten infizieren.



**Abb. 3.28: Knospung von saisonalen H3N2-Viren von Typ II Pneumozyten in der humanen Lunge.** Lungenkulturen wurden für 24 h mit Pan/99 infiziert und anschließend für die elektronenmikroskopische Analyse aufgearbeitet. Viren (schwarze Pfeilspitzen), zelluläre Mikrovilli (offene Pfeilspitzen) und Lamellarkörperchen (LK) sind indiziert.





**Abb. 3.29: Aviäre Viren sind mit Pneumozyten Typ II assoziiert.** Lungenkulturen wurden für 24 h mit Dk/Alb (A) oder mock (B) infiziert und anschließend für die elektronenmikroskopische Analyse aufgearbeitet. Viren (schwarze Pfeilspitzen), zelluläre Mikrovilli (offene Pfeilspitzen) und Lamellarkörperchen (LK) sind indiziert.

Durch Kontrollexperimente konnte durch unsere Kooperationspartner weiterhin gezeigt werden, dass Caveolin (als Pneumozyten Typ I Marker)-positive Zellen negativ für saisonale Influenzaviren sind (Anhang II). Neben infizierten Typ II Pneumozyten fanden sich für alle Viren auch infizierte Alveolar-makrophagen, diese stellten jedoch eine Minderheit dar (Anhang III).

Zusammenfassend infizieren überraschenderweise sowohl saisonale als auch aviäre, porcine und pandemische Influenzaviren vorwiegend Typ II Pneumozyten. Damit ließen sich keine Unterschiede im Zelltropismus der verschiedenen Viren feststellen.

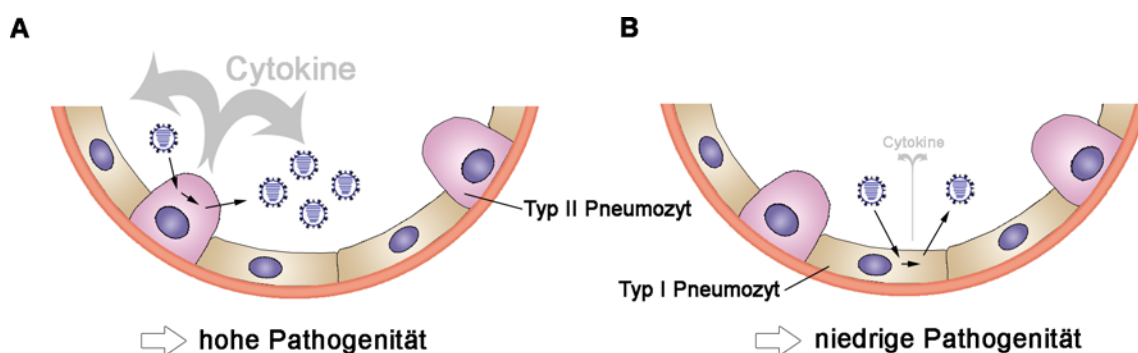




## 4 Diskussion

Die meisten aviären und porzinen Influenzaviren sind im Menschen stark restringiert (Beare und Webster 1991, Beare *et al.* 1972). Dennoch können aviäre Viren vom Subtyp H5N1 sporadisch auf Menschen übertragen werden, bei denen sie zu schweren Atemwegserkrankungen führen. Eine erfolgreiche Übertragung von tierpathogenen Influenzaviren bzw. einzelnen Genomsegmenten dieser Viren auf den Menschen bildet die Grundlage für die Entstehung von pandemischen Virusstämmen. Es existieren Hinweise, dass die schwere Influenzapandemie von 1918 durch die Übertragung eines ursprünglich aviären Virus auf den Menschen ausgelöst wurde (Taubenberger *et al.* 1997) und auch Viren der Pandemien von 1957 und 1968 trugen Genomsegmente von aviären Stämmen (Kawaoka *et al.* 1989). Zur Untersuchung der Faktoren, die es einem aviären oder porzinen Virusstamm ermöglichen, sich in der Bevölkerung zu etablieren, wurden bisher vor allem Zellkultursysteme und Tiermodelle benutzt. Diese können den Verlauf einer Influenzavirusinfektion im Menschen jedoch nur begrenzt wiedergeben. Ziel der vorliegenden Dissertation war es daher ein humanes Lungenkulturmodell aus authentischem Patientenmaterial zu etablieren, welches die Untersuchung von Influenzavirusinfektionen in humanem Gewebe ermöglicht. Durch einen systematischen Vergleich niedrigpathogener und hochpathogener aviärer, porziner und humanpathogener Influenzaviren in diesem humanen Lungenkulturmodell und humanen primären und permanenten Zellen sollten Unterschiede im Infektionszyklus der Viren, in der Aktivierung der angeborenen Immunität und dem Zelltropismus der Viren charakterisiert werden. Ein Einfluss des Zelltropismus auf die unterschiedliche Replikationseffizienz und Pathogenität der Viren wurde bereits diskutiert (Matrosovich *et al.* 2004, Ibricevic *et al.* 2006, Baskin *et al.* 2009, Dobrovolny *et al.* 2010). Baskin *et al.* zeigten, dass H5N1-Viren in infizierten Makakenlungen vorwiegend Typ II Pneumozyten infizierten (Baskin *et al.* 2009), die im Vergleich zu Typ I Zellen eine hohe metabolische Aktivität besitzen und damit große Virus- und Cytokinmengen produzieren könnten (s. Modell Abb. 4.1 A). Außerdem dienen Typ II Pneumozyten als Stammzellen der Typ I Zellen und sind damit essentiell für die Regenerierung der humanen

Lunge nach Schädigungen durch Pathogene oder Umwelteinflüsse. Daher wurde diskutiert, dass die bei H5N1-Infektionen beobachtete hohe Viruslast, die vermehrte Cytokininduktion und die starke Schädigung des Gewebes mit der Fähigkeit der H5N1-Viren Typ II Pneumozyten zu infizieren einhergeht (Baskin *et al.* 2009). Für humanpathogene Viren wurde dagegen gezeigt, dass sie präferenziell an Typ I Zellen binden, die nach Infektion möglicherweise auf Grund ihrer geringeren metabolischen Aktivität weniger Viruspartikel bilden könnten (s. Modell Abb. 4.1 B), welche sich leichter von der adaptiven Immunität kontrollieren ließen (van Riel *et al.* 2007).



**Abb. 4.1: Postuliertes Modell zur Infektion von hochpathogenen aviären und saisonalen Influenzaviren zu Beginn dieser Arbeit.** (A) Hochpathogene aviäre Influenzaviren infizieren Typ II Pneumozyten, die sich durch eine hohe metabolische Aktivität auszeichnen und große Virus- und Cytokinmengen produzieren. Die Infektion führt zudem zur Schädigung der Typ II Zellen, die damit ihrer regenerativen Fähigkeit nicht mehr nachkommen können. Dieses Szenario wäre mit einer hohen Pathogenität assoziiert. (B) Saisonale Influenzaviren infizieren dagegen eher Typ I Pneumozyten, die wegen ihrer geringen metabolischen Aktivität nur geringe Virus- und Cytokinmengen produzieren. Die im Rahmen der Infektion geschädigten Typ I Zellen können durch umliegende Typ II Zellen ersetzt werden. Dieses Szenario wäre mit einer niedrigen Pathogenität assoziiert.

#### 4.1 Etablierung eines humanen Lungenkulturmodells

Die Untersuchung von Faktoren der Speziesbarriere der Influenzaviren erfolgte bisher meist unter Verwendung von Zelllinien und verschiedenen Tiermodellen. Dennoch weisen gerade permanente Zelllinien große Nachteile auf. So spiegeln sie weder die dreidimensionale Struktur noch die verschiedenen miteinander interagierenden Zelltypen des humanen Respirationstraktes wider. Zudem weisen viele transformierte Zelllinien eine defekte oder überhöhte Typ I IFN-Signalkaskade auf und sind damit zur Untersuchung der adaptiven Immunität nur begrenzt geeignet (Desai *et al.* 2006; Diaz *et al.* 1988). Auch das häufig verwendete Mausmodell und das Frettchenmodell besitzen einige

Nachteile. So gehören Mäuse nicht zu den natürlichen Wirten der Influenzaviren und sind damit vor allem für humanpathogene Influenzaviren ohne vorherige Adaptation nicht empfänglich. Dies korreliert mit dem Vorhandensein überwiegend SA $\alpha$ -2,3Gal im murinen Respirationstrakt, während der humane obere Respirationstrakt SA $\alpha$ -2,6Gal aufweist (Ibricevic *et al.* 2006; Shinya *et al.* 2006). Des Weiteren ergeben sich Unterschiede in den vorhandenen Cytokinen zwischen Maus und Mensch. So wurde bisher in Mäusen kein einfaches IL-8 Homolog identifiziert, auch wenn MIP-2 und KC als funktionelle Homologe des IL-8 angesehen werden können (Iizasa und Matsushima 2000). Frettchen sind dagegen für humanpathogene Influenzaviren empfänglich und zeigen einen sehr ähnlichen Krankheitsverlauf wie der Mensch. Derzeit stehen jedoch nur sehr wenige Antikörper für entsprechende Frettchenproteine zur Verfügung, was eine detaillierte Untersuchung im Frettchen erschwert. Aus dieser Motivation heraus wurde versucht ein Modell zu entwickeln, welches die Influenzavirusinfektion im humanen Respirationstrakt möglichst nah wiedergibt. Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte humane Lungenkulturmodell spiegelt die natürliche dreidimensionale Struktur der humanen Lunge wieder. Zudem finden sich in diesem Modell die vielfältigen Zelltypen der Lunge in ihrer natürlichen Anordnung im Gewebeverbund wieder. Im Gegensatz zu Zelllinien, die aus genetisch identischen Zellen bestehen, kann daher in Lungenkulturen die Interaktion der verschiedenen Zelltypen in der humanen Lunge näher untersucht werden. Lektinfärbungen demonstrierten das Vorhandensein von aviären und humanen Rezeptoren in dem Lungenmodell (Ergebnisse Anne Becher). Dies korrelierte mit der Empfänglichkeit für humanpathogene Influenzaviren.

Eine Einschränkung ist, dass das Lungenmaterial, obwohl es selbst tumorfrei war, zumeist von Krebspatienten stammte und damit von Patienten tendenziell älteren Alters, die häufig Zigarettenrauch ausgesetzt waren, oft an COPD (chronischer obstruktiver Lungenerkrankung) litten und häufig vor der Operation mit Steroiden behandelt wurden. In Mausstudien wurde beobachtet, dass eine Belastung mit Rauch die Cytokininduktion beeinflussen kann (Bauer *et al.* 2010). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass patientenspezifische Faktoren z. B. die gemessenen Cytokinmengen quantitativ beeinflussen. Bei den hier durchgeführten Studien konnten allerdings keine gravierenden Unter-

schiede zwischen Raucher- und Nichtraucherlungen hinsichtlich Replikation, Zelltropismus und Cytokininduktion festgestellt werden, sodass auf eine Unterscheidung der beiden Proben verzichtet wurde. Auch ergaben sich keine auffälligen Unterschiede im Replikationsverhalten der Viren zwischen Patienten mit COPD-Diagnose und Patienten ohne diese Diagnose. Dennoch wurde versucht, überwiegend Lungen von Patienten ohne COPD-Diagnose in die Studie einzubeziehen.

Zusammenfassend ermöglicht das hier etablierte Lungenkulturmodell die Untersuchung der Influenzaviren und der nichtadaptiven Immunantwort in authentischem Lungenmaterial und stellt damit ein wertvolles Modell zur Untersuchung verschiedenster Fragestellungen dar. Ähnliche humane Lungenkulturen wurden bereits zur Untersuchung verschiedener Bakterien (z. B. *C. pneumoniae*, *B. anthracis*) und Adenoviren benutzt (Rupp *et al.* 2004, Dromann *et al.* 2010, Booth *et al.* 2004, Chakrabarty *et al.* 2007). Auch für Influenzaviren gibt es erste Publikationen, in denen ein ähnliches Modell benutzt wurde (Wu *et al.* 2010, Chan *et al.* 2010, Jia *et al.* 2010, Chan *et al.* 2009, Nicholls *et al.* 2007).

### **4.2 Aviäre, porcine und humanpathogene Influenza-A-Viren zeigen deutliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Vermehrung in humanen Zell- und Lungenkulturen**

Das im Rahmen dieser Studie etablierte Lungenmodell gab die Empfindlichkeit von Menschen gegenüber den verschiedenen Virusstämmen erstaunlich genau wieder. So replizierten die saisonalen Influenzaviren in den Lungenkulturen effizient. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich das hochpathogene H5N1-Virus Thai/04 zu hohen Titern im Lungenmodell vermehrte. Ebenso wurde bei H5N1-Infektionen in Menschen und Primaten eine hohe Viruslast in der Lunge beschrieben (de Jong *et al.* 2006, Maines *et al.* 2005, Baskin *et al.* 2009). Im Gegensatz dazu wurden bei Menschen, die experimentell mit niedrigpathogenen aviären oder klassisch porcinen Viren infiziert wurden, nur sehr geringe Virustiter nachgewiesen (Beare und Webster 1991, Beare *et al.* 1972). Dies korreliert mit den in dieser Studie sehr geringen Virustitern im Lungenkulturüberstand nach Infektion mit dem niedrigpathogenen aviären Vi-

rus Dk/Alb und dem klassischen Schweinevirus Sw/Wis. Nach Infektion von A549-, Detroit-, NHBE- und B2B-Zellen mit Dk/Alb oder Sw/Wis ließen sich ebenfalls nur sehr geringe Virustiter im Überstand nachweisen. Lediglich auf Calu-3-Zellen replizierten beide Viren effizient. Dies zeigt, dass beide Viren an sich keinen Defekt besitzen sondern in geeigneten Zellen replikationsfähig sind. Auch in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass sich aviäre Viren in A549-Zellen weniger effizient als humanpathogene Viren replizieren (Hayman *et al.* 2006, Hayman *et al.* 2007). Als Ursache für die geringe Vermehrungsfähigkeit aviärer Influenzaviren wurde lange Zeit die Rezeptorspezifität der aviären HA-Proteine und eine fehlende Adaptation der aviären Polymerase diskutiert (Connor *et al.* 1994, Couceiro *et al.* 1993, Gabriel *et al.* 2007, Rogers und Paulson 1983, Subbarao *et al.* 1993, Shinya *et al.* 2004, Hatta *et al.* 2001). Es konnte jedoch kürzlich gezeigt werden, dass in der humanen Lunge sowohl aviäre als auch humane Rezeptoren exprimiert werden (Shinya *et al.* 2006, van Riel *et al.* 2006). Gegenüber der traditionellen Ansicht der Rezeptorspezifität als Erklärung der ineffektiven Replikation aviärer Viren im Menschen hatten diese Ergebnisse einen Paradigmenwechsel zur Folge, da die Rezeptorspezifität für die Etablierung der Infektion keine Rolle mehr spielt. Der Rezeptorbesatz der hier verwendeten Lungenkulturen und Zellen wurde mittels immunhistologischen und FACS-Analysen mit spezifischen Lektinen untersucht. Auch wenn dieses experimentelle System es nicht erlaubt die relative Expression von  $\alpha$ -2,3SA und  $\alpha$ -2,6SA zu vergleichen, da die benutzten Lektine verschiedene Affinitäten zu ihren Liganden haben könnten, konnte gezeigt werden, dass zumindest beide Rezeptoren im humanen Lungenmodell und in NHBE-, A549-, Detroit- und Calu-3-Zellen exprimiert werden (Abb. 3.6, Ergebnisse Anne Becher, Cashman *et al.* 2004, Zeng *et al.* 2007). Dies wurde dadurch bestätigt, dass sowohl in Lungenkulturen als auch in A549-Zellen mit Dk/Alb und Sw/Wis infizierte Zellen in der Immunfluoreszenz nachweisbar waren.

Die pandemischen H1N1-Viren replizierten vergleichbar zu dem saisonalen H1N1-Virus in den Lungenkulturen. Vergleicht man jedoch die maximal erreichten Titer mit denen des hochpathogenen H5N1-Virus, lässt sich ein etwa 10 bis 100fach niedrigerer Titer für die pandemischen Viren feststellen. Auch in Patienten mit schweren pandemischen H1N1-Verläufen wurden keine über-

mäßigen Mengen Virus in Lungenaspiraten gefunden und der Krankheitsverlauf war unabhängig von der Viruslast (Arankalle *et al.* 2010). Es war nicht möglich durch mehrfache Passage der pandemischen Viren eine Erhöhung des Virustiters zu erreichen. Dies spricht entweder für eine bereits bestehende relativ gute Adaptation an den Menschen oder aber dafür, dass die Hürde zur Anpassung relativ hoch ist. Desweiteren fanden sich jedoch auch Unterschiede innerhalb saisonaler Viren. So replizierte das saisonale NC/99 H1N1-Virus zu etwa einer  $\log_{10}$  Stufe geringer als das saisonale Pan/99 H3N2-Virus. Nahezu identische Ergebnisse wurden bereits in Schweinelungenkulturen beschrieben (Van Poucke *et al.* 2010). Die Ursache hierfür ist jedoch derzeit unklar.

### **4.3 Ursachen der Restriktion niedrigpathogener aviärer Influenzaviren in humanen Zellen**

#### **4.3.1 Proteine des niedrigpathogenen aviären Virus werden synthetisiert**

Trotz seiner ineffizienten Replikation konnten für das niedrigpathogene aviäre Virus die viralen Proteine M1, NP, NS1, NS2 und HA in infizierten Zellen nachgewiesen werden. Die Polymerasekomplexe konnten nicht direkt detektiert werden, ihr Vorhandensein wurde aber durch die gelungene Expression der gefundenen Proteine indirekt bestätigt. Die untersuchten viralen Proteine entsprachen in Lokalisation und Quantität denen des saisonalen Virus. Auch für einige andere aviäre Viren wie das FPV/Rostock (H7N1) wurde bereits gezeigt, dass bei einer Infektion von Säugerzellen virale Gene exprimiert werden obwohl die Viren sich nicht effektiv vermehren (Almond 1977). Damit erfolgt die Attenuierung der Viren entweder im späten Infektionszyklus oder auf der Stufe der Infektion der zweiten Zelle. Für FPV/Rostock wurde in humanen HeLa 229-Zellen gezeigt, dass es im späten Infektionsverlauf zu einem fehlerhaften Transport der HA-Proteine zur Zellmembran kommt, so dass sich die Viren nicht richtig zusammenlagern und von der Membran abschnüren können (Portincasa *et al.* 1990). Für das in dieser Arbeit untersuchte Dk/Alb-Virus konnte jedoch mittels der Elektronenmikroskopie die Bildung und Abschnürung der Virionen an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Für Dk/Alb

wurden außerdem im HA-Test Virionen im Zellkulturüberstand bzw. Lungenkulturüberstand nachgewiesen. Somit scheint das hier untersuchte aviäre Virus in der ersten Infektionsrunde Virionen produzieren zu können und die gezeigte ineffiziente Replikation möglicherweise in einer Unfähigkeit der Initiierung der zweiten Infektionsrunde begründet.

### **4.3.2 Gebildete Virionen des niedrigpathogenen aviären Virus sind zum größten Teil nicht infektiös**

Für eine erfolgreiche weitere Infektionsrunde müssen einerseits genügend infektiöse Partikel vorhanden sein und diese andererseits auf eine Zelle treffen, die sich nicht in einem antiviralen Zustand befindet. Es ist bekannt, dass bei einigen Viren wie z. B. *Adenoviridae*, Papilloma-, Polio- und Simianvirus 40 nur ein Bruchteil aller gebildeten Viruspartikel infektiös ist (Flint *et al.* 2004). Auch bei Influenzaviren geht man davon aus, dass nur einer von 20 bis 50 Partikeln infektiös ist (Flint *et al.* 2004). Auffällig ist jedoch, dass die Virionen des aviären Dk/Alb-Virus im Überstand infizierter A549-Zellen und Lungenkulturen ein deutlich geringeres pfu-zu-HAP-Verhältnis und damit eine deutlich verringerte Infektiösität als Virionen des saisonalen Virus aufweisen. Dieses starke Missverhältnis von pfu zu HAP lässt sich in den verwendeten Dk/Alb-Virusstocks nicht feststellen.

Morphologisch ließen sich mit der hier verwendeten elektronenmikroskopischen Darstellung keine Unterschiede zwischen Virionen aviärer und saisonaler Viren in A549-Zellen und Lungenkulturen erkennen. Daher stellte sich die Frage, warum sich die Virionen des aviären Virus von denen des saisonalen Virus so drastisch in ihrer Infektiösität unterscheiden. Damit ein Viruspartikel infektiös und im Plaquetest nachweisbar ist, benötigt es alle acht vRNAs sowie die viralen Proteine, zudem muss das HA in gespaltener Form vorliegen. Daher wurden die Virionen auf Protein- und RNA-Ebene näher charakterisiert. Dabei konnten M1, NP und HA0 in Virionen von aviären und saisonalen Viren nachgewiesen werden. Die Mengen der exprimierten Proteine waren zwischen den Virionen beider Viren etwa vergleichbar. Damit unterscheiden sich die Virionen aviärer und saisonaler Influenzaviren auf Proteinebene vermutlich nicht.

Für eine erfolgreiche Infektion muss das HA0 in HA1 und HA2 durch Serinproteasen gespalten werden. Die Spaltung erfolgt dabei für humane und niedrig-pathogene aviäre Viren an einem Arginin in der Sequenz Q/E-X-R durch im Respirationstrakt exprimierte Serinproteasen wie z. B. TMPRSS2 und HAT (Bottcher *et al.* 2006). Es wurde gezeigt, dass bei der Spaltung auch die umliegenden AS in der Erkennungssequenz und die Zugänglichkeit der Spaltstelle eine wesentliche Rolle spielen (Webster und Rott 1987). Letztere kann z. B. durch Glykosilierungen beeinträchtigt werden, die sich zwischen Virusstämmen deutlich unterscheiden können. Sowohl Pan/99-HA als auch Dk/Alb-HA wurde jedoch im Lungenmodell genauso gespalten wie durch exogen zugefügtes TPCK-Trypsin (Abb. 3.17), wenn auch im Falle des saisonalen HAs etwas effizienter. Da für eine erfolgreiche Membranfusion etwa drei bis vier HA-Trimere benötigt werden (Danieli *et al.* 1996), sollte die Anzahl gespaltener HAs für die Infektiosität der Virionen auch bei nicht vollständiger Spaltung aller HA-Proteine ausreichen.

In frühen Studien wurde berichtet, dass defekte und damit nicht infektiöse Influenzapartikel weniger RNA enthalten als infektiöse Partikel (Ada und Perry 1956, Ada und Perry 1955). Im Rahmen dieses Projektes wurden in aus infizierten A549-Zellkulturüberständen aufgereinigten Virionen aviärer und saisonaler Viren die Segmente M und PB2 auf RNA-Ebene mittels quantitativer „*real time PCR*“ untersucht, dabei konnten nur sehr geringe quantitative Unterschiede festgestellt werden (Ergebnisse Anne Becher). Es ist nicht auszuschließen aber sehr unwahrscheinlich, dass ein anderes hier nicht untersuchtes Segment in defekten Partikeln fehlt. Crumpton *et al.* konnten bereits 1978 zeigen, dass in Präparationen mit vielen defekten Influenzapartikeln die Menge der drei großen Segmente (PB1, PB2 und PA) deutlich reduziert ist. Diese Reduktion ging einher mit dem vermehrten Auftreten kleinerer RNA-Stücke, die 5'- und 3'-terminalen Fragmenten vor allem der drei großen RNA-Segmente entsprechen (Crumpton *et al.* 1978, Skehel und Hay 1978, Jennings *et al.* 1983). Des Weiteren wurden Mutationen im NS2 mit einem fehlenden PA-Segment und damit defekten Virionen assoziiert (Odagiri und Tobita 1990). Dabei wurde vor allem ein Threonin an der Position 32 für eine fehlerhafte Replikation des PA-Segmentes verantwortlich gemacht (Odagiri *et*



*al.* 1994). Sequenzvergleiche zeigten jedoch, dass das hier untersuchte Dk/Alb-Virus diese Mutation nicht aufweist.

Der Zeitraum, über den Virionen ihre infektiösen Eigenschaften behalten, nimmt mit zunehmender Temperatur ab, was vermutlich durch RNA-Strangbrüche verursacht wird (Brown *et al.* 2009, Szretter *et al.* 2006, De Flora und Badolati 1973). Diese Thermostabilität kann sich sowohl zwischen Subtypen als auch zwischen einzelnen Isolaten unterscheiden (Brown *et al.* 2009, Brown *et al.* 2007, Stallknecht *et al.* 1990). Eine Möglichkeit die in dieser Arbeit beobachteten Unterschiede in der Infektiösität der Virionen aviärer und humanpathogener Influenzaviren zu erklären, könnte also in unterschiedlichen Thermostabilitäten der beiden Viren zu sehen sein. Beide Viren zeigten jedoch eine ähnlich verlaufende Abnahme der Infektiösität mit zunehmender Inkubation bei 37°C, sodass die unterschiedlichen Infektiösitäten der Virionen aviärer und humanpathogener Influenzaviren vermutlich nicht durch Unterschiede in der Thermostabilität verursacht werden (Anhang IV).

Die Virionen des hier untersuchten Dk/Alb-Virus unterschieden sich in Morphologie, Proteinzusammensetzung, Spaltbarkeit der HA-Proteine und Thermostabilität kaum von Virionen des saisonalen Stammes. Ob die geringere Infektiösität der Virionen des aviären Virus auf ein fehlendes oder verkürztes RNA-Segment oder auf eine lethale Mutation in diesem zurückzuführen ist, wäre durch weitere Studien mit Hilfe von „*real-time*“ PCR und Sequenzierung oder auch durch morphologische Untersuchungen mittels Elektronencrytomographie zu zeigen.

#### **4.4 Aktivierung der angeborenen Immunantwort durch aviäre, porzine und humanpathogene Influenzaviren**

##### **4.4.1 Cytokininduktion aviärer, porziner und humanpathogener Influenzaviren**

Die angeborene Immunantwort schließt die Cytokinausschüttung von residenten Zellen ein, die wichtig für die Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen und die Initiierung der adaptiven Immunreaktion sind. Während eine ausbalancierte Cytokinantwort normalerweise der Pathogeneliminierung dient,

kann sie bei einer Überstimulation zu schweren immunpathologischen Organschäden führen wie sie z. B. beim ARDS („*acute respiratory distress syndrome*“) auftreten. ARDS wurde bei Patienten mit einer H5N1-Infektion beschrieben und H5N1-Infektionen wurden beim Menschen mit einer hohen Cytokininduktion assoziiert (de Jong *et al.* 2006, Peiris *et al.* 2004). Dabei wurde vor allem eine erhöhte Menge an IL-6, IL-8, IP-10, IFN- $\lambda$ , RANTES und TNF- $\alpha$  im Plasma festgestellt verglichen mit einer unkomplizierten Influenzainfektion (Peiris *et al.* 2004, To *et al.* 2001, de Jong *et al.* 2006). Auch in H5N1-infizierten primären Makrophagen, isolierten Typ II Pneumozyten und NHBE-Zellen wurde diese vermehrte Hypercytokämie beschrieben (Chan *et al.* 2005, Cheung *et al.* 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurde entsprechend sowohl in dem Lungenkulturmodell als auch den primären Zellen und humanen Zellkulturen eine verstärkte Cytokinantwort nach Infektion mit Thai/04 beobachtet (Abb. 3.20 - Abb. 3.23). Die im Vergleich zu Pan/99 vermehrte Induktion von IFN- $\beta$  auf Calu-3 Zellen widerspricht einer früheren Publikation von Zeng *et al.* in der gezeigt wurde, dass eine H5N1-Infektion zu einer attenuierten IFN- $\beta$  Antwort führt (Zeng *et al.* 2007). Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten zum einen auf die unterschiedlichen Virusstämme, zum anderen aber auch auf unterschiedliche Infektionsdosen (moi 1 versus moi 0,01) zurückzuführen sein. Unterschiede zwischen verschiedenen H5N1-Stämmen konnten bereits in früheren Studien unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden (Matthaei 2010).

Interessanterweise wurde auch für das niedrigpathogene Dk/Alb-Virus eine vermehrte Cytokinantwort auf den Lungenkulturen beobachtet. Eine kürzlich publizierte Studie zeigte, dass eine Rezeptorpräferenz eines H5N1-Influenzavirus für SA $\alpha$ -2,3Gal mit einer vermehrten Cytokininduktion assoziiert ist (Ramos *et al.* 2011). So induzierte ein wildtypisches H5N1-Virus mit aviärer Rezeptorbindung deutlich mehr Cytokine in DCs, Makrophagen und NHBEs als eine strikt  $\alpha$ -2,6-bindende Virusmutante (HA:Q226L/G228S). Auch für das hier verwendete Dk/Alb-Virus konnte mittels HA-Rezeptorbindungsassays eine starke SA $\alpha$ -2,3Gal-Bindung nachgewiesen werden, die zu einer vermehrten Cytokininduktion führen könnte. Eine weitere Erklärung für die erhöhte Cytokininduktion der aviären Viren könnte in der Sequenz des viralen Genoms liegen. Greenbaum *et al.* erkannten in einer phylogenetischen Studie, dass das Sequenzmotiv A/U-CG-A/U häufig im Genom

des pandemischen Virus von 1918 und damit eines Virus aviären Ursprungs auftrat, jedoch mit anhaltender Zirkulation im Menschen über die Zeit eliminiert wurde (Greenbaum *et al.* 2008). Auffällig ist, dass dieses Motiv in Säugergenen und Genomen humanpathogener Influenzaviren unterrepräsentiert ist, während es bei Vögeln und aviären Influenzaviren deutlich häufiger anzutreffen ist. Jimenez-Baranda *et al.* beobachteten, dass diese RNA-Motive die Aktivierung von pDCs und damit die Sekretion von IFN- $\alpha$  wahrscheinlich über TLR7-Aktivierung induzieren können (Jimenez-Baranda *et al.* 2011).

Die pandemischen H1N1-Viren 2009 induzierten sowohl in den Zellkulturen als auch in den Lungenkulturen und primären NHBE-Zellen eine mit saisonalen Viren vergleichbar niedrige Cytokinmenge. Ebenso konnten Österlund *et al.* zeigen, dass ein pandemisches H1N1-Virus 2009 in primären humanen DCs und Makrophagen nur schwach IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN $\lambda$ 1 und IP-10 induzierte (Österlund *et al.* 2010).

Für die saisonalen Viren zeigte sich im Vergleich zu nicht infizierten Proben eine leichte Induktion der Chemokine IP-10 ( $\sim 8$ fach), IL-8 ( $\sim 1,4$ fach) und MIP-1 $\beta$  ( $\sim 1,4$ fach). Auch Wu *et al.* zeigten in einem humanen Lungenkulturmodell, dass saisonale H3N2- und H1N1-Viren MIP-1 $\alpha/\beta$ , IL-8 und IP-10 induzieren, wobei IP-10 und MIP-1 $\alpha$  sowohl in Makrophagen als auch in epithelialen Zellen induziert werden. Im Rahmen einer Influenzavirusinfektion kommt es zunächst zu einer Einwanderung von Neutrophilen und im weiteren Verlauf zudem von Monozyten aus der Blutbahn ins Alveolargewebe (Van Reeth 2000). Die im Lungenmodell gezeigte Induktion des auf Neutrophile chemotaktisch wirkenden IL-8 lässt sich gut in Einklang mit dieser frühen Neutrophileneinwanderung bringen. MIP-1 $\beta$  wirkt chemotaktisch auf Monozyten und seine Induktion korreliert mit der Einwanderung von Monozyten (Haesebrouck *et al.* 1985, Van Reeth 2000). Das induzierte Chemokin IP-10 wirkt möglicherweise auf Lymphozyten, die im späten Infektionszyklus in der Lunge nachweisbar sind (Haesebrouck *et al.* 1985, Van Reeth 2000) und ist damit für die Aktivierung der adaptiven Immunität verantwortlich.

#### **4.4.2 Induktion des interferonstimulierten Gens ISG15**

Im hier vorgestellten Lungenmodell war es möglich, auch komplexe Signalwege der angeborenen Immunantwort wie die Induktion von ISG15 und dessen Konjugierung an verschiedene Zielproteine zu untersuchen. So führte die Inkubation des Lungengewebes mit IFN- $\alpha$  sowohl zu einer vermehrten Expression von ISG15 als auch zu einem Anstieg der ISG15-Konjugate. Dies zeigt, dass auch die ISG15-konjugierenden Enzyme E1, E2 und E3 im Lungenmodell durch IFN-Behandlung induziert werden. Auch nach Infektion mit dem hochpathogenen Thai/04-Virus ließ sich eine deutliche Induktion von ISG15 und dessen Konjugaten in Lungenkulturen beobachten, die mit der vermehrten Induktion der Typ I IFNe durch Thai/04 korrelierte. Die im Gegensatz dazu beobachtete geringe Induktion von ISG15 und ISG15-Konjugaten nach Infektion mit dem saisonalen H3N2-Virus korreliert ebenfalls mit der moderaten Typ I IFN-Induktion verbunden mit einer moderaten bis starken ISG15-Induktion und ISG15-Konjugation. Der beobachtete Unterschied in der ISG15-Induktion zwischen den untersuchten Proben deutet vermutlich auf die Varianz zwischen verschiedenen Patienten und/oder Lungenkulturen hin. Für eine eindeutige Aussage müssten daher weitere Patientenproben mit einbezogen werden. Auffällig ist, dass entgegen den Befunden in den Lungenkulturen, in A549-Zellen trotz der unterschiedlichen und teilweise sehr geringen Typ I IFN-Induktion alle Viren ISG15 in vergleichbaren Mengen induzierten. Dies weist darauf hin, dass für die ISG15-Induktion nur sehr geringe Mengen an IFN vorhanden sein müssen oder/und dass die ISG15-Induktion hier unabhängig von IFN z. B. über IRF7 oder IRF-3 erfolgen könnte (Schmid *et al.* 2010, Servant *et al.* 2002). Bei der ISG15-Konjugation in A549-Zellen ließen sich leichte Unterschiede zwischen den verschiedenen Viren feststellen. So zeigten Thai/04 und Dk/Alb im Vergleich zu dem saisonalen Stamm eine leicht vermehrte Konjugation. Warum diese Unterschiede bei den A549-Zellen nur sehr gering und bei den Lungenkulturen sehr deutlich sind, ist derzeit unklar. Eine Möglichkeit besteht darin, dass das primäre Lungengewebe fähig ist viel differenzierter auf eine Virusinfektion und IFN-Ausschüttung zu reagieren als A549-Zellen.

Die für alle Viren beobachtete geringere ISG15-Expression in infizierten A549-Zellen könnte auch einerseits durch den influenzazermittelten „*host cell shut-*

*toff*“ (Gale *et al.* 2000) oder andererseits durch eine Inhibierung des IFN-Signalweges (Wolff und Ludwig 2009) durch die Viren hervorgerufen werden. Bei einer möglichen Inhibierung des IFN-Signalweges spielt jedoch das virale NS1 kaum eine Rolle, da bei Viren ohne vorhandenem NS1 ebenfalls eine geringere ISG15-Expression in infizierten Zellen zu sehen war. Da dieses Phänomen im Rahmen dieser Arbeit für alle Virusstämme zu beobachten war, ist davon auszugehen, dass es hier keine virusspezifischen Unterschiede gibt, die für die Restriktion der porcinen und aviären Viren in A549-Zellen eine große Rolle spielen könnten.

### **4.5 Aviäre und humanpathogene Influenzaviren infizieren in der humanen Lunge vorwiegend Typ II Pneumozyten**

Unterschiede im Zelltropismus wurden in Zusammenhang mit Unterschieden in der Replikation diskutiert (Matrosovich *et al.* 2004, Ibricevic *et al.* 2006, Baskin *et al.* 2009, Dobrovolny *et al.* 2010). So wiesen mathematische Modelle nach, dass ein spezieller Zelltropismus die Influenzavirusreplikation beeinflussen kann (Dobrovolny *et al.* 2010). Zudem zeigten Studien an rekonstituiertem Tracheobronchialepithel, dass aviäre Viren zunächst vorwiegend cilierte Zellen infizierten, während humanpathogene Viren hauptsächlich nichtcilierte Zellen infizierten, die eine erhöhte Proteinsynthese aufweisen und damit höhere Virustiter generieren könnten (Matrosovich *et al.* 2004, Ibricevic *et al.* 2006). Zudem wurde gezeigt, dass H5N1-Viren in infizierten Makaken vorwiegend Typ II Pneumozyten infizieren (Baskin *et al.* 2009), während für humanpathogene Viren beschrieben wurde, dass sie präferenziell an Typ I Zellen binden (van Riel *et al.* 2007). Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die primären Zielzellen für humanpathogene Viren Typ II Pneumozyten sind. Dieses Ergebnis wurde durch elektronenmikroskopische Analysen abknospender Viren gewonnen, wobei Typ II Pneumozyten morphologisch eindeutig durch das Vorhandensein von Lamellarkörperchen identifiziert werden konnten. Dies wurde zudem durch immunhistologische Analysen (mit spezifischen Markerantigenen) unserer Kooperationspartner bestätigt (Anhang I und II). Im Gegensatz dazu erfolgte die Differenzierung von Typ I und Typ II Zellen in der Studie von van Riel *et al.* nur morphologisch. Im Rahmen dieser

Arbeit wurde die Bindung der Viren an mögliche Zielzellen nicht untersucht, daher kann eine reine Bindung des saisonalen Virus an Typ I Pneumozyten nicht ausgeschlossen werden. Dennoch zeigen unsere Daten eindeutig, dass die infizierten Zellen hauptsächlich Typ II Pneumozyten sind.

Im Rahmen dieser Arbeit und durch unsere Kooperationspartner konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sowohl hochpathogene aviäre H5N1-Viren als auch das niedrigpathogene aviäre Virus präferenziell Typ II Pneumozyten infizieren (Abb. 3.29 und Anhang I). Letzteres Ergebnis steht im Einklang mit einer Studie von van Riel *et al.* in der eine vermehrte Bindung aviärer H5N9- und H6N1-Viren an Typ II Zellen gezeigt wurde (van Riel *et al.* 2007).

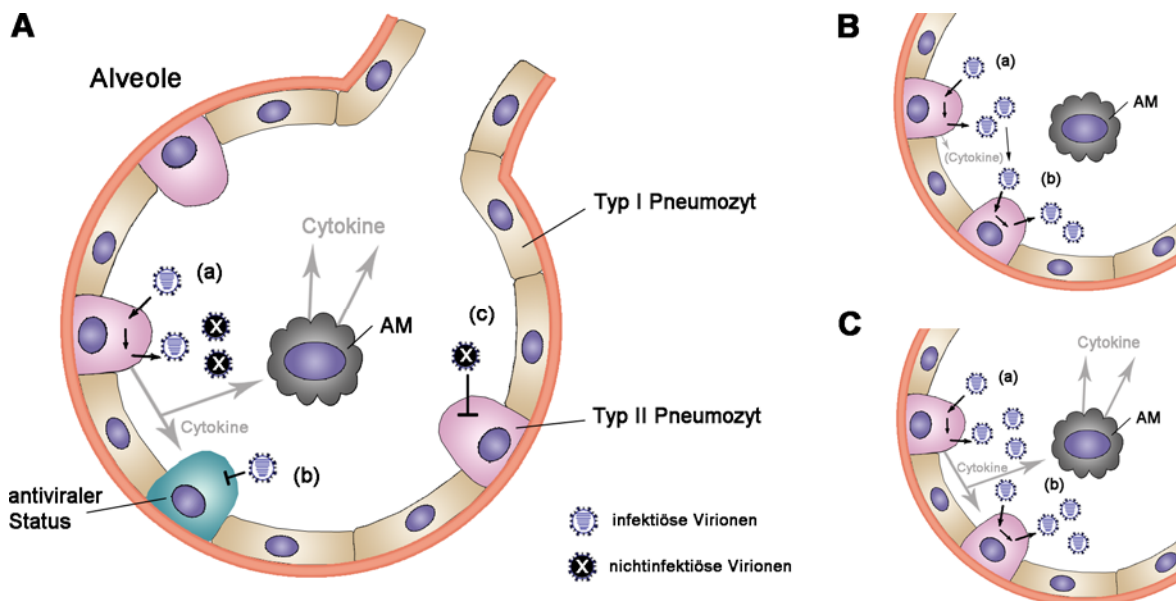
Für die porzinen und pandemischen Viren konnte durch unsere Kooperationspartner ebenfalls gezeigt werden, dass sie hauptsächlich Typ II Pneumozyten infizieren (Anhang I). Dieses wird durch eine histologische Untersuchung an 100 tödlich verlaufenden Fällen der 2009 Pandemie gestützt (Shieh *et al.* 2010). Auch konnte in einer elektronenmikroskopischen Studie eine vermehrte Assoziierung pandemischer Viren mit Typ II Pneumozyten gezeigt werden (Basu *et al.* 2011).

Zusätzlich konnten für alle Viren auch influenzapozitive Makrophagen gefunden werden (Anhang III). Da diese nicht nach Infektion mit UV-inaktivierten Viren identifiziert wurden (Daten nicht gezeigt) ist davon auszugehen, dass auch Makrophagen von humanpathogenen und aviären Influenzaviren infiziert werden. Es wurde bereits gezeigt, dass primäre humane Alveolarmakrophagen empfänglich für Infektionen mit humanpathogenen und aviären Influenzaviren sind (Yu *et al.* 2011). Dennoch stellen infizierte Makrophagen in den Lungenkulturen nur einen Bruchteil aller infizierten Zellen dar und tragen daher wahrscheinlich nicht merkbar zu den gemessenen Virustitern bei, könnten jedoch an der gemessenen Cytokininduktion beteiligt sein.

Der Befund, dass humanpathogene, aviäre und porzine Viren alle fast ausschließlich Typ II Pneumozyten infizieren zeigt, dass die in Zusammenhang mit H5N1-Infektionen beobachtete vermehrte Virusreplikation und Pathogenität im Menschen nicht alleine durch die Fähigkeit erklärt wird, Typ II Pneumozyten zu infizieren. Weitere Studien sind nötig, um einen genaueren Einblick in die komplexe Pathogenität hochpathogener H5N1-Viren zu bekommen.

#### 4.6 Ineffektive Replikation des niedrigpathogenen aviären Virus und effektive Replikation des saisonalen und hochpathogenen Virus - ein Modell

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein niedrigpathogenes aviäres Virus in humanen Lungenkulturen zwar zur Infektion von Typ II



**Abb. 4.2: Modell zur ineffektiven und effektiven Replikation aviärer und saisonaler Influenzaviren in der Alveole.** (A) Das niedrigpathogene aviäre Virus infiziert effektiv Typ II Pneumozyten und bildet Nachkommenviren (a). Ein Großteil der abknospendenden Virionen ist jedoch nicht infektiös. Die Infektion führt außerdem zu einer starken Cytokininduktion, die in den umliegenden Zellen einen antiviralen Status induziert und zudem residente Alveolar-makrophagen (AM) zur weiteren Cytokinsekretion stimuliert. Treffen die wenigen gebildeten infektiösen Viruspartikel auf Zellen, die sich im antiviralen Status befinden (b) oder treffen nichtinfektiösen Viruspartikel auf empfängliche Zellen (c), kommt es zu keiner effektiven Replikation. (B) Das saisonale Virus infiziert ebenfalls Typ II Pneumozyten und bildet infektiöse Nachkommenviren (a), die die umliegenden Zellen infizieren (b) und somit zu einer effektiven Replikation führen. (C) Das hochpathogene aviäre Virus infiziert ebenfalls Typ II Pneumozyten produktiv, führt jedoch im Gegensatz zum saisonalen Virus zu einer starken Cytokininduktion in den Zellen (a). Dennoch infizieren die Nachkommenviren die umliegenden Zellen produktiv (b) und es kommt zu einer effizienten Replikation.

Pneumozyten in der Lage war, aber die gebildeten Nachkommenviren jedoch zum größten Teil nicht infektiös waren. Gleichzeitig führte die Infektion zu einer starken Cytokininduktion. Die wenigen gebildeten infektiösen Viruspartikel treffen damit meist auf sich bereits im antiviralen Zustand befindende Zellen, wodurch sich das niedrigpathogene aviäre Virus vermutlich nur sehr ineffizient vermehren kann (Abb. 4.2 A). Auch saisonale und hochpathogene aviäre Influenzaviren infizierten vorwiegend Typ II Pneumozyten, produzierten im Ge-

gensatz zu dem niedrigpathogenen aviären Virus aber viele infektiöse Nachkommenviren, die die umliegenden Zellen produktiv infizieren können. Diese produktive Infektion erfolgte für das hochpathogene aviäre Virus trotz der vermehrt induzierten Cytokine - wahrscheinlich durch ein Zusammenspiel von einem einerseits sehr schnellen Infektionszyklus mit der Bildung sehr vieler Nachkommenviren, die bereits umliegende Zellen infizieren bevor in diesen ein antiviraler Zustand erreicht wurde und/oder einer andererseits aktiven Inhibierung antiviral wirkender Faktoren in infizierten Zellen.

Abschließend verdeutlicht das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Lungenkulturmodell mit der Fähigkeit selektiv die Influenzavirusreplikation zu unterstützen und die Cytokininduktion im Patienten zu imitieren den Wert von *ex vivo* Modellen um Einblicke in die virale Pathogenität im Menschen zu bekommen. Zudem zeigen gerade die im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Unterschiede in der Influenzavirusreplikation und Cytokininduktion zwischen verschiedenen Zelllinien die Wichtigkeit primärer und physiologisch relevanter Modelle. Das Lungenmodell stellt damit ein wichtiges Instrument für zukünftige Studien z. B. zur Analyse verschiedener Therapeutika wie Neuraminidaseinhibitoren dar.



## Literatur

- Ada, G. L. und Perry, B. T. (1955): Infectivity and nucleic acid content of influenza virus, *Nature* 175 [4448], S. 209-10.
- Ada, G. L. und Perry, B. T. (1956): Influenza virus nucleic acid: relationship between biological characteristics of the virus particle and properties of the nucleic acid, *J Gen Microbiol* 14 [3], S. 623-33.
- AGI (2008): Saisonabschlussberichte der AG Influenza, Robert Koch Institut
- Alford, R. H.; Kasel, J. A.; Gerone, P. J. und Knight, V. (1966): Human influenza resulting from aerosol inhalation, *Proc Soc Exp Biol Med* 122 [3], S. 800-4.
- Almond, J. W. (1977): A single gene determines the host range of influenza virus, *Nature* 270 [5638], S. 617-8.
- Aragon, T.; de la Luna, S.; Novoa, I.; Carrasco, L.; Ortin, J. und Nieto, A. (2000): Eukaryotic translation initiation factor 4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus, *Mol Cell Biol* 20 [17], S. 6259-68.
- Arankalle, V. A.; Lole, K. S.; Arya, R. P.; Tripathy, A. S.; Ramdasi, A. Y.; Chadha, M. S.; Sangle, S. A. und Kadam, D. B. (2010): Role of host immune response and viral load in the differential outcome of pandemic H1N1 (2009) influenza virus infection in Indian patients, *PLoS One* 5 [10].
- Barman, S. und Nayak, D. P. (2000): Analysis of the transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II transmembrane glycoprotein, for apical sorting and raft association, *J Virol* 74 [14], S. 6538-45.
- Baskin, C. R.; Bielefeldt-Ohmann, H.; Tumpey, T. M.; Sabourin, P. J.; Long, J. P.; Garcia-Sastre, A.; Tolnay, A. E.; Albrecht, R.; Pyles, J. A.; Olson, P. H.; Aicher, L. D.; Rosenzweig, E. R.; Murali-Krishna, K.; Clark, E. A.; Kotur, M. S.; Fornek, J. L.; Prohl, S.; Palermo, R. E.; Sabourin, C. L. und Katze, M. G. (2009): Early and sustained innate immune response defines pathology and death in nonhuman primates infected by highly pathogenic influenza virus, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 [9], S. 3455-60.
- Basu, A.; Shelke, V.; Chadha, M.; Kadam, D.; Sangle, S.; Gangodkar, S. und Mishra, A. (2011): Direct imaging of pH1N1 2009 influenza virus replication in alveolar pneumocytes in fatal cases by transmission electron microscopy, *Journal of electron microscopy* 60 [1], S. 89-93.
- Baudin, F.; Petit, I.; Weissenhorn, W. und Ruigrok, R. W. (2001): In vitro dissection of the membrane and RNP binding activities of influenza virus M1 protein, *Virology* 281 [1], S. 102-8.
- Bauer, C. M.; Zavitz, C. C.; Botelho, F. M.; Lambert, K. N.; Brown, E. G.; Mossman, K. L.; Taylor, J. D. und Stampfli, M. R. (2010): Treating viral exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: insights from a mouse model of cigarette smoke and H1N1 influenza infection, *PLoS One* 5 [10], S. e13251.
- Baum, A. und Garcia-Sastre, A. (2010): Induction of type I interferon by RNA viruses: cellular receptors and their substrates, *Amino Acids* 38 [5], S. 1283-99.
- Beare, A. S.; Schild, G. C. und Hall, T. S. (1972): Experimental infection of human volunteers with a swine influenzavirus antigenically related to the human A-Hong Kong-68 virus, *Bull World Health Organ* 47 [4], S. 493-5.
- Beare, A. S. und Webster, R. G. (1991): Replication of avian influenza viruses in humans, *Arch Virol* 119 [1-2], S. 37-42.

- Bielefeldt-Ohmann, H. (1995): The pathologies of bovine viral diarrhoea virus infection. A window on the pathogenesis, *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 11 [3], S. 447-76.
- Biron, C. A.; Nguyen, K. B.; Pien, G. C.; Cousens, L. P. und Salazar-Mather, T. P. (1999): Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines, *Annu Rev Immunol* 17, S. 189-220.
- Booth, J. L.; Coggeshall, K. M.; Gordon, B. E. und Metcalf, J. P. (2004): Adenovirus type 7 induces interleukin-8 in a lung slice model and requires activation of Erk, *J Virol* 78 [8], S. 4156-64.
- Bottcher, E.; Matrosovich, T.; Beyerle, M.; Klenk, H. D.; Garten, W. und Matrosovich, M. (2006): Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium, *J Virol* 80 [19], S. 9896-8.
- Boulo, S.; Akarsu, H.; Ruigrok, R. W. und Baudin, F. (2007): Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes, *Virus Res* 124 [1-2], S. 12-21.
- Brown, J. D.; Goekjian, G.; Poulson, R.; Valeika, S. und Stallknecht, D. E. (2009): Avian influenza virus in water: infectivity is dependent on pH, salinity and temperature, *Vet Microbiol* 136 [1-2], S. 20-6.
- Brown, J. D.; Swayne, D. E.; Cooper, R. J.; Burns, R. E. und Stallknecht, D. E. (2007): Persistence of H5 and H7 avian influenza viruses in water, *Avian diseases* 51 [1 Suppl], S. 285-9.
- Bullough, P. A.; Hughson, F. M.; Skehel, J. J. und Wiley, D. C. (1994): Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion, *Nature* 371 [6492], S. 37-43.
- Burgui, I.; Aragon, T.; Ortin, J. und Nieto, A. (2003): PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes, *J Gen Virol* 84 [Pt 12], S. 3263-74.
- Cashman, S. M.; Morris, D. J. und Kumar-Singh, R. (2004): Adenovirus type 5 pseudotyped with adenovirus type 37 fiber uses sialic acid as a cellular receptor, *Virology* 324 [1], S. 129-39.
- Chakrabarty, K.; Wu, W.; Booth, J. L.; Duggan, E. S.; Nagle, N. N.; Coggeshall, K. M. und Metcalf, J. P. (2007): Human lung innate immune response to *Bacillus anthracis* spore infection, *Infect Immun* 75 [8], S. 3729-38.
- Chan, M. C.; Chan, R. W.; Yu, W. C.; Ho, C. C.; Yuen, K. M.; Fong, J. H.; Tang, L. L.; Lai, W. W.; Lo, A. C.; Chui, W. H.; Sihoe, A. D.; Kwong, D. L.; Wong, D. S.; Tsao, G. S.; Poon, L. L.; Guan, Y.; Nicholls, J. M. und Peiris, J. S. (2010): Tropism and innate host responses of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus in ex vivo and in vitro cultures of human conjunctiva and respiratory tract, *The American journal of pathology* 176 [4], S. 1828-40.
- Chan, M. C.; Cheung, C. Y.; Chui, W. H.; Tsao, S. W.; Nicholls, J. M.; Chan, Y. O.; Chan, R. W.; Long, H. T.; Poon, L. L.; Guan, Y. und Peiris, J. S. (2005): Proinflammatory cytokine responses induced by influenza A (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells, *Respir Res* 6, S. 135.
- Chan, R. W.; Chan, M. C.; Wong, A. C.; Karamanska, R.; Dell, A.; Haslam, S. M.; Sihoe, A. D.; Chui, W. H.; Triana-Baltzer, G.; Li, Q.; Peiris, J. S.; Fang, F. und Nicholls, J. M. (2009): DAS181 inhibits H5N1 influenza virus infection of human lung tissues, *Antimicrob Agents Chemother* 53 [9], S. 3935-41.
- Chen, B. J.; Leser, G. P.; Morita, E. und Lamb, R. A. (2007): Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived virus-like particles, *J Virol* 81 [13], S. 7111-23.

- Chen, G. W.; Chang, S. C.; Mok, C. K.; Lo, Y. L.; Kung, Y. N.; Huang, J. H.; Shih, Y. H.; Wang, J. Y.; Chiang, C.; Chen, C. J. und Shih, S. R. (2006): Genomic signatures of human versus avian influenza A viruses, *Emerg Infect Dis* 12 [9], S. 1353-60.
- Chen, W.; Calvo, P. A.; Malide, D.; Gibbs, J.; Schubert, U.; Bacik, I.; Basta, S.; O'Neill, R.; Schickli, J.; Palese, P.; Henklein, P.; Bennink, J. R. und Yewdell, J. W. (2001): A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death, *Nat Med* 7 [12], S. 1306-12.
- Chen, Z.; Li, Y. und Krug, R. M. (1999): Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery, *Embo J* 18 [8], S. 2273-83.
- Cheung, C. Y.; Poon, L. L.; Lau, A. S.; Luk, W.; Lau, Y. L.; Shortridge, K. F.; Gordon, S.; Guan, Y. und Peiris, J. S. (2002): Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease?, *Lancet* 360 [9348], S. 1831-7.
- Claas, E. C.; Osterhaus, A. D.; van Beek, R.; De Jong, J. C.; Rimmelzwaan, G. F.; Senne, D. A.; Krauss, S.; Shortridge, K. F. und Webster, R. G. (1998): Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus, *Lancet* 351 [9101], S. 472-7.
- Connor, R. J.; Kawaoka, Y.; Webster, R. G. und Paulson, J. C. (1994): Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates, *Virology* 205 [1], S. 17-23.
- Couceiro, J. N.; Paulson, J. C. und Baum, L. G. (1993): Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity, *Virus Res* 29 [2], S. 155-65.
- Cros, J. F.; Garcia-Sastre, A. und Palese, P. (2005): An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein, *Traffic* 6 [3], S. 205-13.
- Crumpton, W. M.; Dimmock, N. J.; Minor, P. D. und Avery, R. J. (1978): The RNAs of defective-interfering influenza virus, *Virology* 90 [2], S. 370-3.
- D'Cunha, J.; Ramanujam, S.; Wagner, R. J.; Witt, P. L.; Knight, E., Jr. und Borden, E. C. (1996): In vitro and in vivo secretion of human ISG15, an IFN-induced immunomodulatory cytokine, *J Immunol* 157 [9], S. 4100-8.
- Danieli, T.; Pelletier, S. L.; Henis, Y. I. und White, J. M. (1996): Membrane fusion mediated by the influenza virus hemagglutinin requires the concerted action of at least three hemagglutinin trimers, *J Cell Biol* 133 [3], S. 559-69.
- Dawood, F. S.; Jain, S.; Finelli, L.; Shaw, M. W.; Lindstrom, S.; Garten, R. J.; Gubareva, L. V.; Xu, X.; Bridges, C. B. und Uyeki, T. M. (2009): Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans, *N Engl J Med* 360 [25], S. 2605-15.
- De Flora, S. und Badolati, G. (1973): Thermal inactivation of untreated and gamma-irradiated A2-Aichi-2-68 influenza virus, *The Journal of general virology* 20 [2], S. 261-5.
- de Jong, J. C.; Claas, E. C.; Osterhaus, A. D.; Webster, R. G. und Lim, W. L. (1997): A pandemic warning?, *Nature* 389 [6651], S. 554.
- de Jong, M. D.; Simmons, C. P.; Thanh, T. T.; Hien, V. M.; Smith, G. J.; Chau, T. N.; Hoang, D. M.; Chau, N. V.; Khanh, T. H.; Dong, V. C.; Qui, P. T.; Cam, B. V.; Ha do, Q.; Guan, Y.; Peiris, J. S.; Chinh, N. T.; Hien, T. T. und Farrar, J. (2006): Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia, *Nat Med* 12 [10], S. 1203-7.

- Desai, S. D.; Haas, A. L.; Wood, L. M.; Tsai, Y. C.; Pestka, S.; Rubin, E. H.; Saleem, A.; Nur, E. Kamal A. und Liu, L. F. (2006): Elevated expression of ISG15 in tumor cells interferes with the ubiquitin/26S proteasome pathway, *Cancer Res* 66 [2], S. 921-8.
- Desselberger, U.; Racaniello, V. R.; Zazra, J. J. und Palese, P. (1980): The 3' and 5'-terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity, *Gene* 8 [3], S. 315-28.
- Dias, A.; Bouvier, D.; Crepin, T.; McCarthy, A. A.; Hart, D. J.; Baudin, F.; Cusack, S. und Ruigrok, R. W. (2009): The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit, *Nature* 458 [7240], S. 914-8.
- Diaz, M. O.; Ziemien, S.; Le Beau, M. M.; Pitha, P.; Smith, S. D.; Chilcote, R. R. und Rowley, J. D. (1988): Homozygous deletion of the alpha- and beta 1-interferon genes in human leukemia and derived cell lines, *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 [14], S. 5259-63.
- Didcock, L.; Young, D. F.; Goodbourn, S. und Randall, R. E. (1999): Sendai virus and simian virus 5 block activation of interferon-responsive genes: importance for virus pathogenesis, *J Virol* 73 [4], S. 3125-33.
- Diebold, S. S.; Kaisho, T.; Hemmi, H.; Akira, S. und Reis e Sousa, C. (2004): Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA, *Science* 303 [5663], S. 1529-31.
- Dobrovolsky, H. M.; Baron, M. J.; Gieschke, R.; Davies, B. E.; Jumbe, N. L. und Beauchemin, C. A. (2010): Exploring cell tropism as a possible contributor to influenza infection severity, *PLoS One* 5 [11], S. e13811.
- Dromann, D.; Rupp, J.; Rohmann, K.; Osbahr, S.; Ulmer, A. J.; Marwitz, S.; Roschmann, K.; Abdullah, M.; Schultz, H.; Vollmer, E.; Zabel, P.; Dalhoff, K. und Goldmann, T. (2010): The TGF-beta-pseudoreceptor BAMBI is strongly expressed in COPD lungs and regulated by nontypeable *Haemophilus influenzae*, *Respir Res* 11, S. 67.
- Ducatez, M. F.; Olinger, C. M.; Owoade, A. A.; De Landtsheer, S.; Ammerlaan, W.; Niesters, H. G.; Osterhaus, A. D.; Fouchier, R. A. und Muller, C. P. (2006): Avian flu: multiple introductions of H5N1 in Nigeria, *Nature* 442 [7098], S. 37.
- Durfee, L. A.; Lyon, N.; Seo, K. und Huibregtse, J. M. (2010): The ISG15 conjugation system broadly targets newly synthesized proteins: implications for the antiviral function of ISG15, *Mol Cell* 38 [5], S. 722-32.
- Ellis, T. M.; Bousfield, R. B.; Bissett, L. A.; Dyrting, K. C.; Luk, G. S.; Tsim, S. T.; Sturm-Ramirez, K.; Webster, R. G.; Guan, Y. und Malik Peiris, J. S. (2004): Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002, *Avian Pathol* 33 [5], S. 492-505.
- Fechter, P.; Mingay, L.; Sharps, J.; Chambers, A.; Fodor, E. und Brownlee, G. G. (2003): Two aromatic residues in the PB2 subunit of influenza A RNA polymerase are crucial for cap binding, *J Biol Chem* 278 [22], S. 20381-8.
- Flick, R.; Neumann, G.; Hoffmann, E.; Neumeier, E. und Hobom, G. (1996): Promoter elements in the influenza vRNA terminal structure, *RNA* 2 [10], S. 1046-57.
- Flint, S. J.; Enquist, L. W.; Racaniello, V. R. und Skalka, A. M. (2004): principles of virology, 2nd. Auflage, ASM.
- Flohr, F.; Schneider-Schaulies, S.; Haller, O. und Kochs, G. (1999): The central interactive region of human MxA GTPase is involved in GTPase activation and interaction with viral target structures, *FEBS letters* 463 [1-2], S. 24-8.

- Floyd, D. L.; Ragains, J. R.; Skehel, J. J.; Harrison, S. C. und van Oijen, A. M. (2008): Single-particle kinetics of influenza virus membrane fusion, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 [40], S. 15382-7.
- Fortes, P.; Beloso, A. und Ortin, J. (1994): Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport, *Embo J* 13 [3], S. 704-12.
- Fouchier, R. A.; Schneeberger, P. M.; Rozendaal, F. W.; Broekman, J. M.; Kemink, S. A.; Munster, V.; Kuiken, T.; Rimmelzwaan, G. F.; Schutten, M.; Van Doornum, G. J.; Koch, G.; Bosman, A.; Koopmans, M. und Osterhaus, A. D. (2004): Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 [5], S. 1356-61.
- Fraser, C.; Donnelly, C. A.; Cauchemez, S.; Hanage, W. P.; Van Kerkhove, M. D.; Hollingsworth, T. D.; Griffin, J.; Baggaley, R. F.; Jenkins, H. E.; Lyons, E. J.; Jombart, T.; Hinsley, W. R.; Grassly, N. C.; Balloux, F.; Ghani, A. C.; Ferguson, N. M.; Rambaut, A.; Pybus, O. G.; Lopez-Gatell, H.; Alpuche-Aranda, C. M.; Chapela, I. B.; Zavala, E. P.; Guevara, D. M.; Checchi, F.; Garcia, E.; Hugonnet, S. und Roth, C. (2009): Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings, *Science* 324 [5934], S. 1557-61.
- Gabriel, G.; Abram, M.; Keiner, B.; Wagner, R.; Klenk, H. D. und Stech, J. (2007): Differential polymerase activity in avian and mammalian cells determines host range of influenza virus, *J Virol* 81 [17], S. 9601-4.
- Gack, M. U.; Albrecht, R. A.; Urano, T.; Inn, K. S.; Huang, I. C.; Carnero, E.; Farzan, M.; Inoue, S.; Jung, J. U. und Garcia-Sastre, A. (2009): Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I, *Cell Host Microbe* 5 [5], S. 439-49.
- Gale, M., Jr.; Tan, S. L. und Katze, M. G. (2000): Translational control of viral gene expression in eukaryotes, *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 64 [2], S. 239-80.
- Gallucci, S.; Lolkema, M. und Matzinger, P. (1999): Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells, *Nat Med* 5 [11], S. 1249-55.
- Gamblin, S. J.; Haire, L. F.; Russell, R. J.; Stevens, D. J.; Xiao, B.; Ha, Y.; Vasisht, N.; Steinhauer, D. A.; Daniels, R. S.; Elliot, A.; Wiley, D. C. und Skehel, J. J. (2004): The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin, *Science* 303 [5665], S. 1838-42.
- Garcia-Sastre, A. und Biron, C. A. (2006): Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in detente, *Science* 312 [5775], S. 879-82.
- Gessani, S. und Belardelli, F. (1998): IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance, *Cytokine Growth Factor Rev* 9 [2], S. 117-23.
- Gomez-Puertas, P.; Albo, C.; Perez-Pastrana, E.; Vivo, A. und Portela, A. (2000): Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding, *J Virol* 74 [24], S. 11538-47.
- Govorkova, E. A.; Rehg, J. E.; Krauss, S.; Yen, H. L.; Guan, Y.; Peiris, M.; Nguyen, T. D.; Hanh, T. H.; Puthavathana, P.; Long, H. T.; Buranathai, C.; Lim, W.; Webster, R. G. und Hoffmann, E. (2005): Lethality to ferrets of H5N1 influenza viruses isolated from humans and poultry in 2004, *J Virol* 79 [4], S. 2191-8.
- Greenbaum, B. D.; Levine, A. J.; Bhanot, G. und Rabadan, R. (2008): Patterns of evolution and host gene mimicry in influenza and other RNA viruses, *PLoS pathogens* 4 [6], S. e1000079.
- Gregoriades, A. und Frangione, B. (1981): Insertion of influenza M protein into the viral lipid bilayer and localization of site of insertion, *J Virol* 40 [1], S. 323-8.

- Guan, Y.; Peiris, J. S.; Lipatov, A. S.; Ellis, T. M.; Dyrting, K. C.; Krauss, S.; Zhang, L. J.; Webster, R. G. und Shortridge, K. F. (2002): Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 [13], S. 8950-5.
- Guo, Z.; Chen, L. M.; Zeng, H.; Gomez, J. A.; Plowden, J.; Fujita, T.; Katz, J. M.; Donis, R. O. und Sambhara, S. (2007): NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I, *Am J Respir Cell Mol Biol* 36 [3], S. 263-9.
- Haesebrouck, F.; Biront, P.; Pensaert, M. B. und Leunen, J. (1985): Epizootics of respiratory tract disease in swine in Belgium due to H3N2 influenza virus and experimental reproduction of disease, *American journal of veterinary research* 46 [9], S. 1926-8.
- Hatada, E.; Saito, S. und Fukuda, R. (1999): Mutant influenza viruses with a defective NS1 protein cannot block the activation of PKR in infected cells, *J Virol* 73 [3], S. 2425-33.
- Hatta, M.; Gao, P.; Halfmann, P. und Kawaoka, Y. (2001): Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses, *Science* 293 [5536], S. 1840-2.
- Hatta, M.; Hatta, Y.; Kim, J. H.; Watanabe, S.; Shinya, K.; Nguyen, T.; Lien, P. S.; Le, Q. M. und Kawaoka, Y. (2007): Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice, *PLoS Pathog* 3 [10], S. 1374-9.
- Hayman, A.; Comely, S.; Lackenby, A.; Hartgroves, L. C.; Goodbourn, S.; McCauley, J. W. und Barclay, W. S. (2007): NS1 proteins of avian influenza A viruses can act as antagonists of the human alpha/beta interferon response, *J Virol* 81 [5], S. 2318-27.
- Hayman, A.; Comely, S.; Lackenby, A.; Murphy, S.; McCauley, J.; Goodbourn, S. und Barclay, W. (2006): Variation in the ability of human influenza A viruses to induce and inhibit the IFN-beta pathway, *Virology* 347 [1], S. 52-64.
- Helenius, A. (1992): Unpacking the incoming influenza virus, *Cell* 69 [4], S. 577-8.
- Hirst, G. K. (1941): The Agglutination of Red Cells by Allantoic Fluid of Chick Embryos Infected with Influenza Virus, *Science* 94 [2427], S. 22-3.
- Hiscott, J. (2007): Triggering the innate antiviral response through IRF-3 activation, *J Biol Chem* 282 [21], S. 15325-9.
- Horimoto, T. und Kawaoka, Y. (2005): Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents, *Nat Rev Microbiol* 3 [8], S. 591-600.
- Hornung, V.; Ellegast, J.; Kim, S.; Brzozka, K.; Jung, A.; Kato, H.; Poeck, H.; Akira, S.; Conzelmann, K. K.; Schlee, M.; Endres, S. und Hartmann, G. (2006): 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I, *Science* 314 [5801], S. 994-7.
- Hwang, S. Y.; Greenway, A. L.; McMullen, G. L. und Hertzog, P. J. (1994): Detection of cells producing murine interferon-alpha using antipeptide antibodies, *Immunol Cell Biol* 72 [3], S. 234-40.
- Ibricevic, A.; Pekosz, A.; Walter, M. J.; Newby, C.; Battaile, J. T.; Brown, E. G.; Holtzman, M. J. und Brody, S. L. (2006): Influenza virus receptor specificity and cell tropism in mouse and human airway epithelial cells, *J Virol* 80 [15], S. 7469-80.
- Iizasa, H. und Matsushima, K. (2000): IL-8/CXCL8, In Oppenheim, J.J.; Feldmann, M.; Durum, S.K.; Hirano, T.; Vilcek, J. und Nicola, N.A. (Hrsg.): Cytokine Reference 1; 2. Auflage, Academic Press., S. 1062.
- Isaacs, A. und Lindenmann, J. (1957): Virus interference. I. The interferon, *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147 [927], S. 258-67.

- Ito, T.; Couceiro, J. N.; Kelm, S.; Baum, L. G.; Krauss, S.; Castrucci, M. R.; Donatelli, I.; Kida, H.; Paulson, J. C.; Webster, R. G. und Kawaoka, Y. (1998): Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential, *J Virol* 72 [9], S. 7367-73.
- Jennings, P. A.; Finch, J. T.; Winter, G. und Robertson, J. S. (1983): Does the higher order structure of the influenza virus ribonucleoprotein guide sequence rearrangements in influenza viral RNA?, *Cell* 34 [2], S. 619-27.
- Jia, D.; Rahbar, R.; Chan, R. W.; Lee, S. M.; Chan, M. C.; Wang, B. X.; Baker, D. P.; Sun, B.; Peiris, J. S.; Nicholls, J. M. und Fish, E. N. (2010): Influenza virus non-structural protein 1 (NS1) disrupts interferon signaling, *PLoS One* 5 [11], S. e13927.
- Jimenez-Baranda, S.; Greenbaum, B.; Manches, O.; Handler, J.; Rabadan, R.; Levine, A. und Bhardwaj, N. (2011): Oligonucleotide motifs that disappear during the evolution of influenza virus in humans increase alpha interferon secretion by plasmacytoid dendritic cells, *J Virol* 85 [8], S. 3893-904.
- Junqueira und Carneiro (2004): Histologie, 6. Auflage.
- Kamijo, R.; Shapiro, D.; Gerecitano, J.; Le, J.; Bosland, M. und Vilcek, J. (1994): Biological functions of IFN-gamma and IFN-alpha/beta: lessons from studies in gene knockout mice, *Hokkaido Igaku Zasshi* 69 [6], S. 1332-8.
- Kates, M.; Allison, A. C.; Tyrell, D. A. und James, A. T. (1962): Origin of lipids in influenza virus, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 27, S. 293-301.
- Kato, H.; Sato, S.; Yoneyama, M.; Yamamoto, M.; Uematsu, S.; Matsui, K.; Tsujimura, T.; Takeda, K.; Fujita, T.; Takeuchi, O. und Akira, S. (2005): Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response, *Immunity* 23 [1], S. 19-28.
- Kawaoka, Y.; Krauss, S. und Webster, R. G. (1989): Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics, *J Virol* 63 [11], S. 4603-8.
- Kido, H.; Murakami, M.; Oba, K.; Chen, Y. und Towatari, T. (1999): Cellular proteinases trigger the infectivity of the influenza A and Sendai viruses, *Mol Cells* 9 [3], S. 235-44.
- Kido, H.; Yokogoshi, Y.; Sakai, K.; Tashiro, M.; Kishino, Y.; Fukutomi, A. und Katunuma, N. (1992): Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. A possible activator of the viral fusion glycoprotein, *J Biol Chem* 267 [19], S. 13573-9.
- Kilpatrick, A. M.; Chmura, A. A.; Gibbons, D. W.; Fleischer, R. C.; Marra, P. P. und Daszak, P. (2006): Predicting the global spread of H5N1 avian influenza, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 [51], S. 19368-73.
- Klenk, H. D. und Rott, R. (1988): The molecular biology of influenza virus pathogenicity, *Adv Virus Res* 34, S. 247-81.
- Klenk, H. D.; Rott, R.; Orlich, M. und Blodorn, J. (1975): Activation of influenza A viruses by trypsin treatment, *Virology* 68 [2], S. 426-39.
- Kobasa, D.; Takada, A.; Shinya, K.; Hatta, M.; Halfmann, P.; Theriault, S.; Suzuki, H.; Nishimura, H.; Mitamura, K.; Sugaya, N.; Usui, T.; Murata, T.; Maeda, Y.; Watanabe, S.; Suresh, M.; Suzuki, T.; Suzuki, Y.; Feldmann, H. und Kawaoka, Y. (2004): Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus, *Nature* 431 [7009], S. 703-7.
- Korteweg, C. und Gu, J. (2008): Pathology, molecular biology, and pathogenesis of avian influenza A (H5N1) infection in humans, *The American journal of pathology* 172 [5], S. 1155-70.

- Kotenko, S. V.; Gallagher, G.; Baurin, V. V.; Lewis-Antes, A.; Shen, M.; Shah, N. K.; Langer, J. A.; Sheikh, F.; Dickensheets, H. und Donnelly, R. P. (2003): IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex, *Nat Immunol* 4 [1], S. 69-77.
- Krug, R. M.; Broni, B. A. und Bouloy, M. (1979): Are the 5' ends of influenza viral mRNAs synthesized in vivo donated by host mRNAs?, *Cell* 18 [2], S. 329-34.
- Kuiken, T.; Holmes, E. C.; McCauley, J.; Rimmelzwaan, G. F.; Williams, C. S. und Grenfell, B. T. (2006): Host species barriers to influenza virus infections, *Science* 312 [5772], S. 394-7.
- Kuzuhara, T.; Kise, D.; Yoshida, H.; Horita, T.; Murazaki, Y.; Nishimura, A.; Echigo, N.; Utsunomiya, H. und Tsuge, H. (2009): Structural basis of the influenza A virus RNA polymerase PB2 RNA-binding domain containing the pathogenicity-determinant lysine 627 residue, *J Biol Chem* 284 [11], S. 6855-60.
- Lai, C.; Struckhoff, J. J.; Schneider, J.; Martinez-Sobrido, L.; Wolff, T.; Garcia-Sastre, A.; Zhang, D. E. und Lenschow, D. J. (2009): Mice lacking the ISG15 E1 enzyme UBE1L demonstrate increased susceptibility to both mouse-adapted and non-mouse-adapted influenza B virus infection, *J Virol* 83 [2], S. 1147-51.
- Lamb, R.A., Krug, R.M. (2001): *Fields Virology*, 1, 4. Auflage, Knipe, D.M., Howley, P.M., Lippincott, Williams & Williams, Philadelphia, ISBN: 0-7817-1832-5.
- Lämmli, UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* [227], S. 680-685.
- Lazarowitz, S. G.; Goldberg, A. R. und Choppin, P. W. (1973): Proteolytic cleavage by plasmin of the HA polypeptide of influenza virus: host cell activation of serum plasminogen, *Virology* 56 [1], S. 172-80.
- Le Bon, A.; Schiavoni, G.; D'Agostino, G.; Gresser, I.; Belardelli, F. und Tough, D. F. (2001): Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo, *Immunity* 14 [4], S. 461-70.
- Leigh, M. W.; Connor, R. J.; Kelm, S.; Baum, L. G. und Paulson, J. C. (1995): Receptor specificity of influenza virus influences severity of illness in ferrets, *Vaccine* 13 [15], S. 1468-73.
- Lemon, S. M. und Mahmoud, A. A. (2005): The threat of pandemic influenza: are we ready?, *Biosecur Bioterror* 3 [1], S. 70-3.
- Lenschow, D. J.; Lai, C.; Frias-Staheli, N.; Giannakopoulos, N. V.; Lutz, A.; Wolff, T.; Osiak, A.; Levine, B.; Schmidt, R. E.; Garcia-Sastre, A.; Leib, D. A.; Pekosz, A.; Knobeloch, K. P.; Horak, I. und Virgin, H. W. th (2007): IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 [4], S. 1371-6.
- Leser, G. P. und Lamb, R. A. (2005): Influenza virus assembly and budding in raft-derived microdomains: a quantitative analysis of the surface distribution of HA, NA and M2 proteins, *Virology* 342 [2], S. 215-27.
- Li, M. L.; Rao, P. und Krug, R. M. (2001): The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits, *Embo J* 20 [8], S. 2078-86.
- Lu, Y.; Wambach, M.; Katze, M. G. und Krug, R. M. (1995): Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor, *Virology* 214 [1], S. 222-8.
- Ludwig, S. und Wolff, T. (2009): Influenza A virus TRIMs the type I interferon response, *Cell Host Microbe* 5 [5], S. 420-1.



- Lüllmann-Rauch (2003): Histologie, 2. Auflage.
- Lund, J. M.; Alexopoulou, L.; Sato, A.; Karow, M.; Adams, N. C.; Gale, N. W.; Iwasaki, A. und Flavell, R. A. (2004): Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 [15], S. 5598-603.
- Luo, G. X.; Luytjes, W.; Enami, M. und Palese, P. (1991): The polyadenylation signal of influenza virus RNA involves a stretch of uridines followed by the RNA duplex of the panhandle structure, *J Virol* 65 [6], S. 2861-7.
- Maines, T. R.; Lu, X. H.; Erb, S. M.; Edwards, L.; Guarner, J.; Greer, P. W.; Nguyen, D. C.; Szretter, K. J.; Chen, L. M.; Thawatsupha, P.; Chittaganpitch, M.; Waicharoen, S.; Nguyen, D. T.; Nguyen, T.; Nguyen, H. H.; Kim, J. H.; Hoang, L. T.; Kang, C.; Phuong, L. S.; Lim, W.; Zaki, S.; Donis, R. O.; Cox, N. J.; Katz, J. M. und Tumpey, T. M. (2005): Avian influenza (H5N1) viruses isolated from humans in Asia in 2004 exhibit increased virulence in mammals, *J Virol* 79 [18], S. 11788-800.
- Marcus, P. I.; Ngunjiri, J. M. und Sekellick, M. J. (2009): Dynamics of biologically active subpopulations of influenza virus: plaque-forming, noninfectious cell-killing, and defective interfering particles, *J Virol* 83 [16], S. 8122-30.
- Marsh, G. A.; Rabadan, R.; Levine, A. J. und Palese, P. (2008): Highly conserved regions of influenza A virus polymerase gene segments are critical for efficient viral RNA packaging, *J Virol* 82 [5], S. 2295-304.
- Martin, K. und Helenius, A. (1991a): Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import, *Cell* 67 [1], S. 117-30.
- Martin, K. und Helenius, A. (1991b): Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus, *J Virol* 65 [1], S. 232-44.
- Massin, P.; van der Werf, S. und Naffakh, N. (2001): Residue 627 of PB2 is a determinant of cold sensitivity in RNA replication of avian influenza viruses, *J Virol* 75 [11], S. 5398-404.
- Matlin, K. S.; Reggio, H.; Helenius, A. und Simons, K. (1981): Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line, *J Cell Biol* 91 [3 Pt 1], S. 601-13.
- Matrosovich, M. N.; Matrosovich, T. Y.; Gray, T.; Roberts, N. A. und Klenk, H. D. (2004): Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 [13], S. 4620-4.
- Matrosovich, M.; Tuzikov, A.; Bovin, N.; Gambaryan, A.; Klimov, A.; Castrucci, M. R.; Donatelli, I. und Kawaoka, Y. (2000): Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals, *J Virol* 74 [18], S. 8502-12.
- Matrosovich, M.; Zhou, N.; Kawaoka, Y. und Webster, R. (1999): The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties, *J Virol* 73 [2], S. 1146-55.
- Matthaei, M. (2010): Induktion und Blockade des Typ I Interferonsystems durch Influenza A Viren des Subtyps H5N1, Dissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät I Biowissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Mazur, I.; Anhlán, D.; Mitzner, D.; Wixler, L.; Schubert, U. und Ludwig, S. (2008): The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein, *Cell Microbiol* 10 [5], S. 1140-52.
- McFadden, G. (2005): Poxvirus tropism, *Nat Rev Microbiol* 3 [3], S. 201-13.

- Mibayashi, M.; Martinez-Sobrido, L.; Loo, Y. M.; Cardenas, W. B.; Gale, M., Jr. und Garcia-Sastre, A. (2007): Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus, *J Virol* 81 [2], S. 514-24.
- Min, J. Y. und Krug, R. M. (2006): The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 [18], S. 7100-5.
- Muller, U.; Steinhoff, U.; Reis, L. F.; Hemmi, S.; Pavlovic, J.; Zinkernagel, R. M. und Aguet, M. (1994): Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense, *Science* 264 [5167], S. 1918-21.
- Murakami, M.; Towatari, T.; Ohuchi, M.; Shiota, M.; Akao, M.; Okumura, Y.; Parry, M. A. und Kido, H. (2001): Mini-plasmin found in the epithelial cells of bronchioles triggers infection by broad-spectrum influenza A viruses and Sendai virus, *Eur J Biochem* 268 [10], S. 2847-55.
- Murti, K. G.; Brown, P. S.; Bean, W. J., Jr. und Webster, R. G. (1992): Composition of the helical internal components of influenza virus as revealed by immunogold labeling/electron microscopy, *Virology* 186 [1], S. 294-9.
- Naeve, C. W.; Hinshaw, V. S. und Webster, R. G. (1984): Mutations in the hemagglutinin receptor-binding site can change the biological properties of an influenza virus, *J Virol* 51 [2], S. 567-9.
- Nayak, D. P.; Hui, E. K. und Barman, S. (2004): Assembly and budding of influenza virus, *Virus Res* 106 [2], S. 147-65.
- Nemeroff, M. E.; Barabino, S. M.; Li, Y.; Keller, W. und Krug, R. M. (1998): Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3' end formation of cellular pre-mRNAs, *Mol Cell* 1 [7], S. 991-1000.
- Neumann, G. und Kawaoka, Y. (2006): Host range restriction and pathogenicity in the context of influenza pandemic, *Emerg Infect Dis* 12 [6], S. 881-6.
- Neumann, G.; Noda, T. und Kawaoka, Y. (2009): Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus, *Nature* 459 [7249], S. 931-9.
- Nicholls, J. M.; Chan, M. C.; Chan, W. Y.; Wong, H. K.; Cheung, C. Y.; Kwong, D. L.; Wong, M. P.; Chui, W. H.; Poon, L. L.; Tsao, S. W.; Guan, Y. und Peiris, J. S. (2007): Tropism of avian influenza A (H5N1) in the upper and lower respiratory tract, *Nat Med* 13 [2], S. 147-9.
- Noah, D. L.; Twu, K. Y. und Krug, R. M. (2003): Cellular antiviral responses against influenza A virus are countered at the posttranscriptional level by the viral NS1A protein via its binding to a cellular protein required for the 3' end processing of cellular pre-mRNAs, *Virology* 307 [2], S. 386-95.
- Noda, T.; Sagara, H.; Yen, A.; Takada, A.; Kida, H.; Cheng, R. H. und Kawaoka, Y. (2006): Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles, *Nature* 439 [7075], S. 490-2.
- O'Neill, R. E.; Jaskunas, R.; Blobel, G.; Palese, P. und Moroianu, J. (1995): Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import, *J Biol Chem* 270 [39], S. 22701-4.
- O'Neill, R. E.; Talon, J. und Palese, P. (1998): The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins, *Embo J* 17 [1], S. 288-96.
- Odagiri, T. und Tashiro, M. (1997): Segment-specific noncoding sequences of the influenza virus genome RNA are involved in the specific competition between defective interfering RNA and its progenitor RNA segment at the virion assembly step, *J Virol* 71 [3], S. 2138-45.

- Odagiri, T. und Tobita, K. (1990): Mutation in NS2, a nonstructural protein of influenza A virus, extragenically causes aberrant replication and expression of the PA gene and leads to generation of defective interfering particles, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 [15], S. 5988-92.
- Odagiri, T.; Tominaga, K.; Tobita, K. und Ohta, S. (1994): An amino acid change in the non-structural NS2 protein of an influenza A virus mutant is responsible for the generation of defective interfering (DI) particles by amplifying DI RNAs and suppressing complementary RNA synthesis, *J Gen Virol* 75 ( Pt 1), S. 43-53.
- Okumura, F.; Zou, W. und Zhang, D. E. (2007): ISG15 modification of the eIF4E cognate 4EHP enhances cap structure-binding activity of 4EHP, *Genes Dev* 21 [3], S. 255-60.
- Opitz, B.; Rejaibi, A.; Dauber, B.; Eckhard, J.; Vinzing, M.; Schmeck, B.; Hippenstiel, S.; Suttorp, N. und Wolff, T. (2007): IFN $\beta$  induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein, *Cell Microbiol* 9 [4], S. 930-8.
- Osterlund, P.; Pirhonen, J.; Ikonen, N.; Ronkko, E.; Strengell, M.; Makela, S. M.; Broman, M.; Hamming, O. J.; Hartmann, R.; Ziegler, T. und Julkunen, I. (2010): Pandemic H1N1 2009 influenza A virus induces weak cytokine responses in human macrophages and dendritic cells and is highly sensitive to the antiviral actions of interferons, *J Virol* 84 [3], S. 1414-22.
- Palese, P. (1977): The genes of influenza virus, *Cell* 10 [1], S. 1-10.
- Palese, P. und Shaw, M. (2007): Orthomyxoviridae: the viruses and their replication., In (Hrsg.): *Fields Virology*; 5. Auflage, S. 1647-1689.
- Palese, P.; Tobita, K.; Ueda, M. und Compans, R. W. (1974): Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase, *Virology* 61 [2], S. 397-410.
- Park, Y. W. und Katze, M. G. (1995): Translational control by influenza virus. Identification of cis-acting sequences and trans-acting factors which may regulate selective viral mRNA translation, *J Biol Chem* 270 [47], S. 28433-9.
- Peiris, J. S.; Yu, W. C.; Leung, C. W.; Cheung, C. Y.; Ng, W. F.; Nicholls, J. M.; Ng, T. K.; Chan, K. H.; Lai, S. T.; Lim, W. L.; Yuen, K. Y. und Guan, Y. (2004): Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease, *Lancet* 363 [9409], S. 617-9.
- Pichlmair, A.; Schulz, O.; Tan, C. P.; Naslund, T. I.; Liljestrom, P.; Weber, F. und Reis e Sousa, C. (2006): RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates, *Science* 314 [5801], S. 997-1001.
- Pinto, L. H.; Holsinger, L. J. und Lamb, R. A. (1992): Influenza virus M2 protein has ion channel activity, *Cell* 69 [3], S. 517-28.
- Plotch, S. J.; Bouloy, M.; Ulmanen, I. und Krug, R. M. (1981): A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription, *Cell* 23 [3], S. 847-58.
- Poon, L. L.; Pritlove, D. C.; Fodor, E. und Brownlee, G. G. (1999): Direct evidence that the poly(A) tail of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a U track in the virion RNA template, *J Virol* 73 [4], S. 3473-6.
- Portela, A. und Digard, P. (2002): The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication, *J Gen Virol* 83 [Pt 4], S. 723-34.
- Portincasa, P.; Conti, G. und Chezzi, C. (1990): Abortive replication of influenza A viruses in HeLa 229 cells, *Virus Res* 18 [1], S. 29-40.

- Pritlove, D. C.; Poon, L. L.; Fodor, E.; Sharps, J. und Brownlee, G. G. (1998): Polyadenylation of influenza virus mRNA transcribed in vitro from model virion RNA templates: requirement for 5' conserved sequences, *J Virol* 72 [2], S. 1280-6.
- Purwar, R.; Campbell, J.; Murphy, G.; Richards, W. G.; Clark, R. A. und Kupper, T. S. (2011): Resident memory T cells (T(RM)) are abundant in human lung: diversity, function, and antigen specificity, *PLoS One* 6 [1], S. e16245.
- Qiu, Y. und Krug, R. M. (1994): The influenza virus NS1 protein is a poly(A)-binding protein that inhibits nuclear export of mRNAs containing poly(A), *J Virol* 68 [4], S. 2425-32.
- Ramos, I.; Bernal-Rubio, D.; Durham, N.; Belicha-Villanueva, A.; Lowen, A. C.; Steel, J. und Fernandez-Sesma, A. (2011): Effects of receptor binding specificity of avian influenza virus on the human innate immune response, *J Virol* 85 [9], S. 4421-31.
- Reynolds, E. S. (1963): The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy, *J Cell Biol* 17, S. 208-12.
- Robb, N. C.; Smith, M.; Vreede, F. T. und Fodor, E. (2009): NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome, *J Gen Virol* 90 [Pt 6], S. 1398-407.
- Robertson, J. S.; Schubert, M. und Lazzarini, R. A. (1981): Polyadenylation sites for influenza virus mRNA, *J Virol* 38 [1], S. 157-63.
- Rogers, G. N. und Paulson, J. C. (1983): Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin, *Virology* 127 [2], S. 361-73.
- Ross, M.H. und Pawlina, W. (2010): Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology, Lippincott Williams & Wilkins, ISBN: 9780781772006.
- Rupp, J.; Droemann, D.; Goldmann, T.; Zabel, P.; Solbach, W.; Vollmer, E.; Branscheid, D.; Dalhoff, K. und Maass, M. (2004): Alveolar epithelial cells type II are major target cells for *C. pneumoniae* in chronic but not in acute respiratory infection, *FEMS Immunol Med Microbiol* 41 [3], S. 197-203.
- Sadler, A. J. und Williams, B. R. (2008): Interferon-inducible antiviral effectors, *Nat Rev Immunol* 8 [7], S. 559-68.
- Salomon, R.; Franks, J.; Govorkova, E. A.; Ilyushina, N. A.; Yen, H. L.; Hulse-Post, D. J.; Humberd, J.; Trichet, M.; Rehg, J. E.; Webby, R. J.; Webster, R. G. und Hoffmann, E. (2006): The polymerase complex genes contribute to the high virulence of the human H5N1 influenza virus isolate A/Vietnam/1203/04, *J Exp Med* 203 [3], S. 689-97.
- Samuel, C. E. (2001): Antiviral actions of interferons, *Clin Microbiol Rev* 14 [4], S. 778-809, table of contents.
- Scheid, A. und Choppin, P. W. (1974): Identification of biological activities of paramyxovirus glycoproteins. Activation of cell fusion, hemolysis, and infectivity of proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of Sendai virus, *Virology* 57 [2], S. 475-90.
- Schmid, S.; Mordstein, M.; Kochs, G.; Garcia-Sastre, A. und Tenover, B. R. (2010): Transcription factor redundancy ensures induction of the antiviral state, *J Biol Chem* 285 [53], S. 42013-22.
- Scholtissek, C.; Rohde, W.; Von Hoyningen, V. und Rott, R. (1978): On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2, *Virology* 87 [1], S. 13-20.

- Seo, Y. J. und Hahm, B. (2010): Type I interferon modulates the battle of host immune system against viruses, *Adv Appl Microbiol* 73, S. 83-101.
- Servant, M. J.; Grandvaux, N. und Hiscott, J. (2002): Multiple signaling pathways leading to the activation of interferon regulatory factor 3, *Biochemical pharmacology* 64 [5-6], S. 985-92.
- Seth, R. B.; Sun, L. und Chen, Z. J. (2006): Antiviral innate immunity pathways, *Cell Res* 16 [2], S. 141-7.
- Shapiro, G. I. und Krug, R. M. (1988): Influenza virus RNA replication in vitro: synthesis of viral template RNAs and virion RNAs in the absence of an added primer, *J Virol* 62 [7], S. 2285-90.
- Sheppard, P.; Kindsvogel, W.; Xu, W.; Henderson, K.; Schlutsmeyer, S.; Whitmore, T. E.; Kuestner, R.; Garrigues, U.; Birks, C.; Roraback, J.; Ostrander, C.; Dong, D.; Shin, J.; Presnell, S.; Fox, B.; Haldeman, B.; Cooper, E.; Taft, D.; Gilbert, T.; Grant, F. J.; Tackett, M.; Krivan, W.; McKnight, G.; Clegg, C.; Foster, D. und Klucher, K. M. (2003): IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R, *Nat Immunol* 4 [1], S. 63-8.
- Shieh, W. J.; Blau, D. M.; Denison, A. M.; Deleon-Carnes, M.; Adem, P.; Bhatnagar, J.; Sumner, J.; Liu, L.; Patel, M.; Batten, B.; Greer, P.; Jones, T.; Smith, C.; Bartlett, J.; Montague, J.; White, E.; Rollin, D.; Gao, R.; Seales, C.; Jost, H.; Metcalfe, M.; Goldsmith, C. S.; Humphrey, C.; Schmitz, A.; Drew, C.; Paddock, C.; Uyeki, T. M. und Zaki, S. R. (2010): 2009 pandemic influenza A (H1N1): pathology and pathogenesis of 100 fatal cases in the United States, *The American journal of pathology* 177 [1], S. 166-75.
- Shinde, V.; Bridges, C. B.; Uyeki, T. M.; Shu, B.; Balish, A.; Xu, X.; Lindstrom, S.; Gubareva, L. V.; Deyde, V.; Garten, R. J.; Harris, M.; Gerber, S.; Vagasky, S.; Smith, F.; Pascoe, N.; Martin, K.; Dufficy, D.; Ritger, K.; Conover, C.; Quinlisk, P.; Klimov, A.; Bresee, J. S. und Finelli, L. (2009): Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005-2009, *N Engl J Med* 360 [25], S. 2616-25.
- Shinya, K.; Ebina, M.; Yamada, S.; Ono, M.; Kasai, N. und Kawaoka, Y. (2006): Avian flu: influenza virus receptors in the human airway, *Nature* 440 [7083], S. 435-6.
- Shinya, K.; Hamm, S.; Hatta, M.; Ito, H.; Ito, T. und Kawaoka, Y. (2004): PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice, *Virology* 320 [2], S. 258-66.
- Simonsen, L.; Clarke, M. J.; Williamson, G. D.; Stroup, D. F.; Arden, N. H. und Schonberger, L. B. (1997): The impact of influenza epidemics on mortality: introducing a severity index, *Am J Public Health* 87 [12], S. 1944-50.
- Sims, L. D.; Ellis, T. M.; Liu, K. K.; Dyrting, K.; Wong, H.; Peiris, M.; Guan, Y. und Shortridge, K. F. (2003): Avian influenza in Hong Kong 1997-2002, *Avian Dis* 47 [3 Suppl], S. 832-8.
- Skaug, B. und Chen, Z. J. (2010): Emerging role of ISG15 in antiviral immunity, *Cell* 143 [2], S. 187-90.
- Skehel, J. J. und Hay, A. J. (1978): Nucleotide sequences at the 5' termini of influenza virus RNAs and their transcripts, *Nucleic Acids Res* 5 [4], S. 1207-19.
- Skehel, J. J. und Wiley, D. C. (2000): Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin, *Annu Rev Biochem* 69, S. 531-69.
- Skorko, R.; Summers, D. F. und Galarza, J. M. (1991): Influenza A virus in vitro transcription: roles of NS1 and NP proteins in regulating RNA synthesis, *Virology* 180 [2], S. 668-77.

- Smith, G. L. und Hay, A. J. (1982): Replication of the influenza virus genome, *Virology* 118 [1], S. 96-108.
- Smith, G. L.; Levin, J. Z.; Palese, P. und Moss, B. (1987): Synthesis and cellular location of the ten influenza polypeptides individually expressed by recombinant vaccinia viruses, *Virology* 160 [2], S. 336-45.
- Sommereyans, C.; Paul, S.; Staeheli, P. und Michiels, T. (2008): IFN-lambda (IFN-lambda) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo, *PLoS Pathog* 4 [3], S. e1000017.
- Sorensen, G. L.; Husby, S. und Holmskov, U. (2007): Surfactant protein A and surfactant protein D variation in pulmonary disease, *Immunobiology* 212 [4-5], S. 381-416.
- Sprenger, M. J.; Mulder, P. G.; Beyer, W. E.; Van Strik, R. und Masurel, N. (1993): Impact of influenza on mortality in relation to age and underlying disease, 1967-1989, *Int J Epidemiol* 22 [2], S. 334-40.
- Stallknecht, D. E.; Shane, S. M.; Kearney, M. T. und Zwank, P. J. (1990): Persistence of avian influenza viruses in water, *Avian diseases* 34 [2], S. 406-11.
- Stark, G. R.; Kerr, I. M.; Williams, B. R.; Silverman, R. H. und Schreiber, R. D. (1998): How cells respond to interferons, *Annu Rev Biochem* 67, S. 227-64.
- Steel, J.; Lowen, A. C.; Mubareka, S. und Palese, P. (2009): Transmission of influenza virus in a mammalian host is increased by PB2 amino acids 627K or 627E/701N, *PLoS Pathog* 5 [1], S. e1000252.
- Stevens, A.; Lowe, J.S. und Tiedemann, K. (1997): Histologie des Menschen, Chapman & Hall, ISBN: 9783131132925.
- Stevens, J.; Blixt, O.; Glaser, L.; Taubenberger, J. K.; Palese, P.; Paulson, J. C. und Wilson, I. A. (2006): Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities, *J Mol Biol* 355 [5], S. 1143-55.
- Stieneke-Grober, A.; Vey, M.; Angliker, H.; Shaw, E.; Thomas, G.; Roberts, C.; Klenk, H. D. und Garten, W. (1992): Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease, *Embo J* 11 [7], S. 2407-14.
- Subbarao, E. K.; London, W. und Murphy, B. R. (1993): A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range, *J Virol* 67 [4], S. 1761-4.
- Subbarao, K.; Klimov, A.; Katz, J.; Regnery, H.; Lim, W.; Hall, H.; Perdue, M.; Swayne, D.; Bender, C.; Huang, J.; Hemphill, M.; Rowe, T.; Shaw, M.; Xu, X.; Fukuda, K. und Cox, N. (1998): Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness, *Science* 279 [5349], S. 393-6.
- Sugrue, R. J.; Belshe, R. B. und Hay, A. J. (1990): Palmitoylation of the influenza A virus M2 protein, *Virology* 179 [1], S. 51-6.
- Sugrue, R. J. und Hay, A. J. (1991): Structural characteristics of the M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel, *Virology* 180 [2], S. 617-24.
- Sun, S.; Schiller, J. H. und Gazdar, A. F. (2007): Lung cancer in never smokers--a different disease, *Nat Rev Cancer* 7 [10], S. 778-90.
- Szretter, K. J.; Balish, A. L. und Katz, J. M. (2006): Influenza: propagation, quantification, and storage, *Current protocols in microbiology* Chapter 15, S. Unit 15G 1.

- Tang, Y.; Zhong, G.; Zhu, L.; Liu, X.; Shan, Y.; Feng, H.; Bu, Z.; Chen, H. und Wang, C. (2010): Herc5 attenuates influenza A virus by catalyzing ISGylation of viral NS1 protein, *J Immunol* 184 [10], S. 5777-90.
- Tashiro, M.; Ciborowski, P.; Klenk, H. D.; Pulverer, G. und Rott, R. (1987): Role of Staphylococcus protease in the development of influenza pneumonia, *Nature* 325 [6104], S. 536-7.
- Taubenberger, J. K.; Reid, A. H.; Krafft, A. E.; Bijwaard, K. E. und Fanning, T. G. (1997): Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus, *Science* 275 [5307], S. 1793-6.
- Tiley, L. S.; Hagen, M.; Matthews, J. T. und Krystal, M. (1994): Sequence-specific binding of the influenza virus RNA polymerase to sequences located at the 5' ends of the viral RNAs, *J Virol* 68 [8], S. 5108-16.
- To, K. F.; Chan, P. K.; Chan, K. F.; Lee, W. K.; Lam, W. Y.; Wong, K. F.; Tang, N. L.; Tsang, D. N.; Sung, R. Y.; Buckley, T. A.; Tam, J. S. und Cheng, A. F. (2001): Pathology of fatal human infection associated with avian influenza A H5N1 virus, *J Med Virol* 63 [3], S. 242-6.
- Tran, T. H.; Nguyen, T. L.; Nguyen, T. D.; Luong, T. S.; Pham, P. M.; Nguyen, V. C.; Pham, T. S.; Vo, C. D.; Le, T. Q.; Ngo, T. T.; Dao, B. K.; Le, P. P.; Nguyen, T. T.; Hoang, T. L.; Cao, V. T.; Le, T. G.; Nguyen, D. T.; Le, H. N.; Nguyen, K. T.; Le, H. S.; Le, V. T.; Christiane, D.; Tran, T. T.; Menno de, J.; Schultsz, C.; Cheng, P.; Lim, W.; Horby, P. und Farrar, J. (2004): Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam, *N Engl J Med* 350 [12], S. 1179-88.
- Van Poucke, S. G.; Nicholls, J. M.; Nauwynck, H. J. und Van Reeth, K. (2010): Replication of avian, human and swine influenza viruses in porcine respiratory explants and association with sialic acid distribution, *Virol J* 7, S. 38.
- Van Reeth, K. (2000): Cytokines in the pathogenesis of influenza, *Vet Microbiol* 74 [1-2], S. 109-16.
- van Riel, D.; Munster, V. J.; de Wit, E.; Rimmelzwaan, G. F.; Fouchier, R. A.; Osterhaus, A. D. und Kuiken, T. (2006): H5N1 Virus Attachment to Lower Respiratory Tract, *Science* 312 [5772], S. 399.
- van Riel, D.; Munster, V. J.; de Wit, E.; Rimmelzwaan, G. F.; Fouchier, R. A.; Osterhaus, A. D. und Kuiken, T. (2007): Human and avian influenza viruses target different cells in the lower respiratory tract of humans and other mammals, *The American journal of pathology* 171 [4], S. 1215-23.
- Veit, M. und Schmidt, M. F. (1993): Timing of palmitoylation of influenza virus hemagglutinin, *FEBS Lett* 336 [2], S. 243-7.
- Vreede, F. T.; Jung, T. E. und Brownlee, G. G. (2004): Model suggesting that replication of influenza virus is regulated by stabilization of replicative intermediates, *J Virol* 78 [17], S. 9568-72.
- Wakefield, L. und Brownlee, G. G. (1989): RNA-binding properties of influenza A virus matrix protein M1, *Nucleic Acids Res* 17 [21], S. 8569-80.
- Wang, P.; Palese, P. und O'Neill, R. E. (1997): The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal, *J Virol* 71 [3], S. 1850-6.
- Webster, R. G.; Bean, W. J.; Gorman, O. T.; Chambers, T. M. und Kawaoka, Y. (1992): Evolution and ecology of influenza A viruses, *Microbiol Rev* 56 [1], S. 152-79.
- Webster, R. G. und Rott, R. (1987): Influenza virus A pathogenicity: the pivotal role of hemagglutinin, *Cell* 50 [5], S. 665-6.
- Wharton, S. A.; Belshe, R. B.; Skehel, J. J. und Hay, A. J. (1994): Role of virion M2 protein in influenza virus uncoating: specific reduction in the rate of membrane

- fusion between virus and liposomes by amantadine, *J Gen Virol* 75 ( Pt 4), S. 945-8.
- Whittaker, G.; Bui, M. und Helenius, A. (1996): Nuclear trafficking of influenza virus ribonucleoproteins in heterokaryons, *J Virol* 70 [5], S. 2743-56.
- Whittaker, G. R. (2001): Intracellular trafficking of influenza virus: clinical implications for molecular medicine, *Expert Rev Mol Med* 2001, S. 1-13.
- Wolff, T. und Ludwig, S. (2009): Influenza viruses control the vertebrate type I interferon system: factors, mechanisms, and consequences, *J Interferon Cytokine Res* 29 [9], S. 549-57.
- Wright, P.F.; Neumann, G und Y., Kawaoka (2007): Orthomyxoviruses, In (Hrsg.): *Fields Virology*; 5. Auflage, S. 1691-1740.
- Wu, W.; Booth, J. L.; Duggan, E. S.; Wu, S.; Patel, K. B.; Coggeshall, K. M. und Metcalf, J. P. (2010): Innate immune response to H3N2 and H1N1 influenza virus infection in a human lung organ culture model, *Virology* 396 [2], S. 178-88.
- Yassine, H. M.; Khatrri, M.; Zhang, Y. J.; Lee, C. W.; Byrum, B. A.; O'Quin, J.; Smith, K. A. und Saif, Y. M. (2009): Characterization of triple reassortant H1N1 influenza A viruses from swine in Ohio, *Vet Microbiol* 139 [1-2], S. 132-9.
- Yasuda, J.; Nakada, S.; Kato, A.; Toyoda, T. und Ishihama, A. (1993): Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix, *Virology* 196 [1], S. 249-55.
- Ye, Z.; Liu, T.; Offringa, D. P.; McInnis, J. und Levandowski, R. A. (1999): Association of influenza virus matrix protein with ribonucleoproteins, *J Virol* 73 [9], S. 7467-73.
- Yeager, C. L.; Ashmun, R. A.; Williams, R. K.; Cardellicchio, C. B.; Shapiro, L. H.; Look, A. T. und Holmes, K. V. (1992): Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E, *Nature* 357 [6377], S. 420-2.
- Yoneyama, M.; Kikuchi, M.; Natsukawa, T.; Shinobu, N.; Imaizumi, T.; Miyagishi, M.; Taira, K.; Akira, S. und Fujita, T. (2004): The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses, *Nat Immunol* 5 [7], S. 730-7.
- Yu, W. C.; Chan, R. W.; Wang, J.; Travanty, E. A.; Nicholls, J. M.; Peiris, J. S.; Mason, R. J. und Chan, M. C. (2011): Viral replication and innate host responses in primary human alveolar epithelial cells and alveolar macrophages infected with influenza H5N1 and H1N1 viruses, *J Virol*.
- Yuen, K. Y.; Chan, P. K.; Peiris, M.; Tsang, D. N.; Que, T. L.; Shortridge, K. F.; Cheung, P. T.; To, W. K.; Ho, E. T.; Sung, R. und Cheng, A. F. (1998): Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus, *Lancet* 351 [9101], S. 467-71.
- Zamarin, D.; Ortigoza, M. B. und Palese, P. (2006): Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice, *J Virol* 80 [16], S. 7976-83.
- Zebedee, S. L. und Lamb, R. A. (1988): Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions, *J Virol* 62 [8], S. 2762-72.
- Zeng, H.; Goldsmith, C.; Thawatsupha, P.; Chittaganpitch, M.; Waicharoen, S.; Zaki, S.; Tumpey, T. M. und Katz, J. M. (2007): Highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses elicit an attenuated type I interferon response in polarized human bronchial epithelial cells, *J Virol* 81 [22], S. 12439-49.
- Zhao, C.; Denison, C.; Huibregtse, J. M.; Gygi, S. und Krug, R. M. (2005): Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed

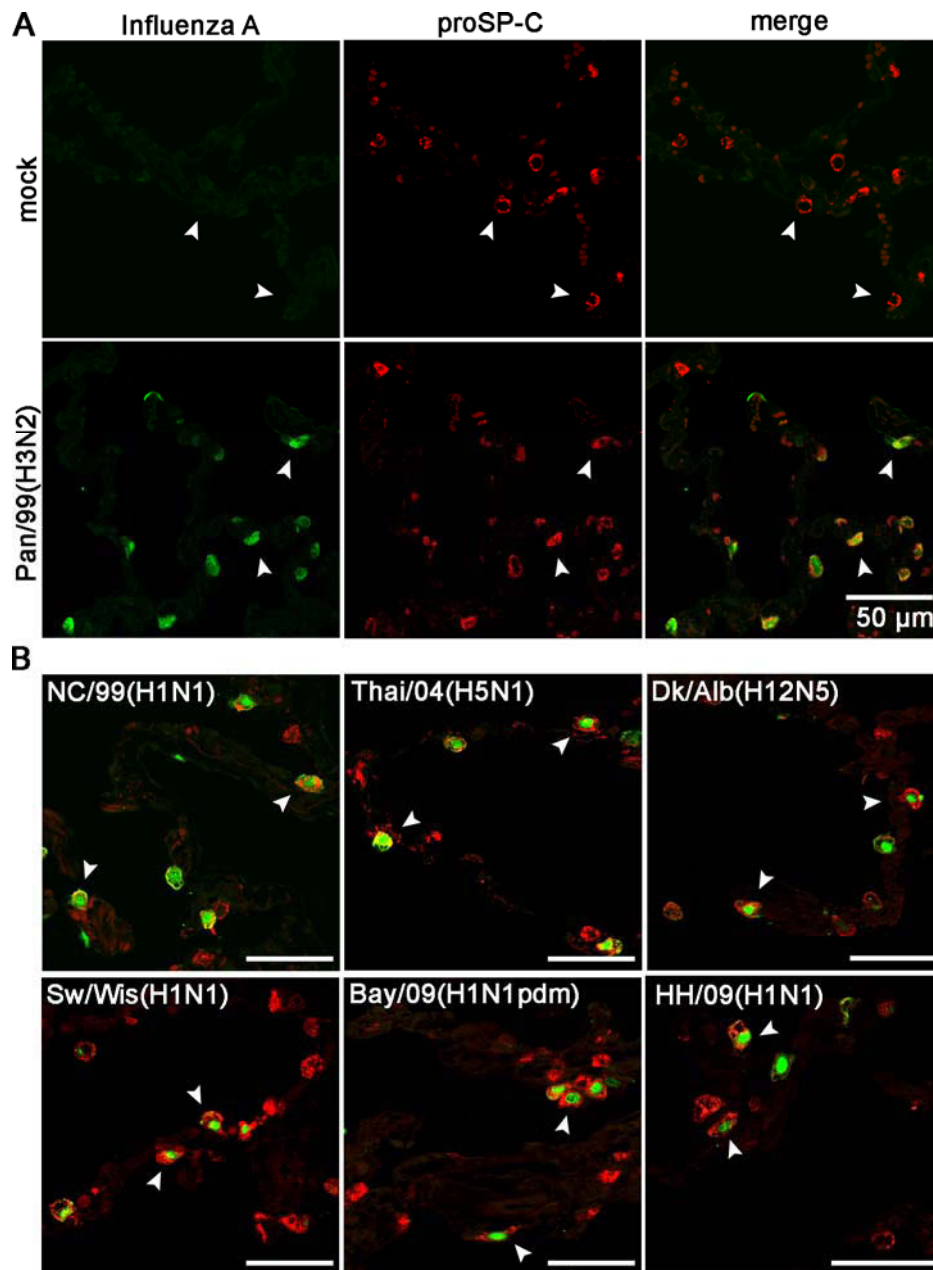


- proteins functioning in diverse cellular pathways, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 [29], S. 10200-5.
- Zhao, C.; Hsiang, T. Y.; Kuo, R. L. und Krug, R. M. (2010): ISG15 conjugation system targets the viral NS1 protein in influenza A virus-infected cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 [5], S. 2253-8.



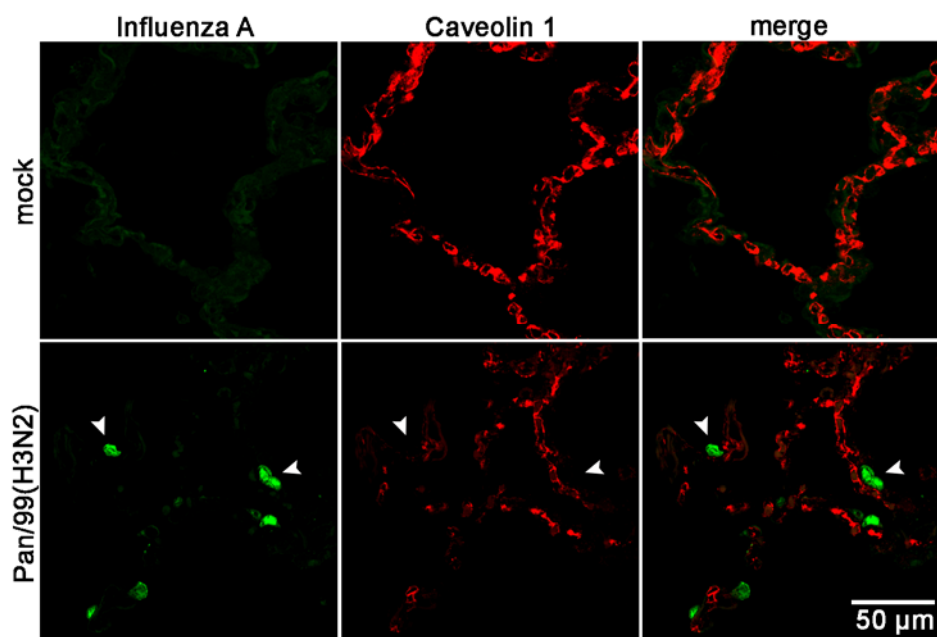
## Anhang

### Anhang I



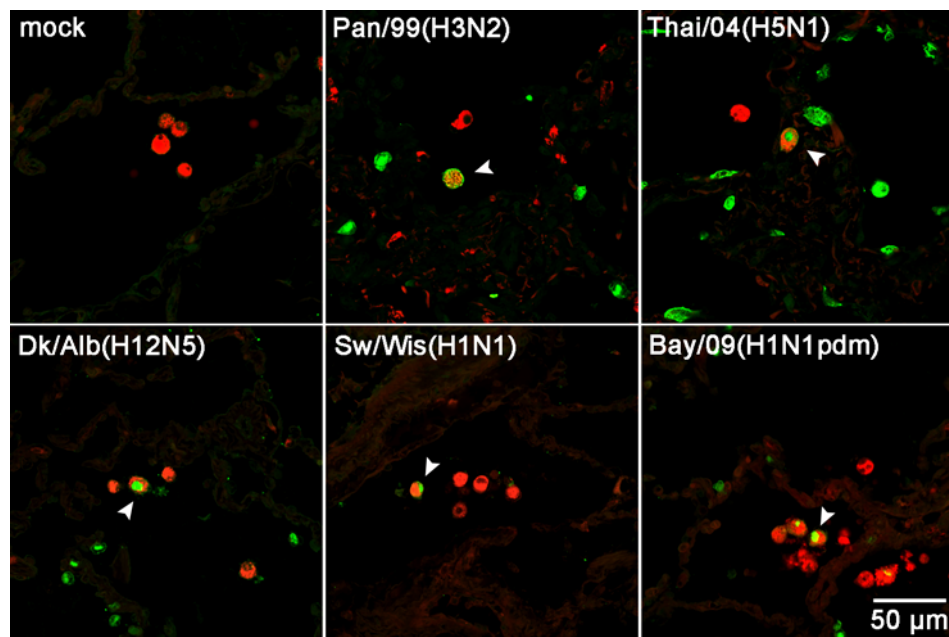
**Saisonale, aviäre, porcine und pandemische Influenzaviren infizieren hauptsächlich Typ II Pneumozyten.** Lungenkulturen wurden für 24 h mit den angegebenen Viren infiziert und anschließend für die immunhistologische Analyse aufgearbeitet. Schnitte wurden mit einem anti-Influenza-AK (grün) und einem proSP-C-AK (rot) inkubiert. Maßstab 50µm (Ergebnisse Anne Becher, Weinheimer and Becher *et al.* (eingereicht)).

Anhang II



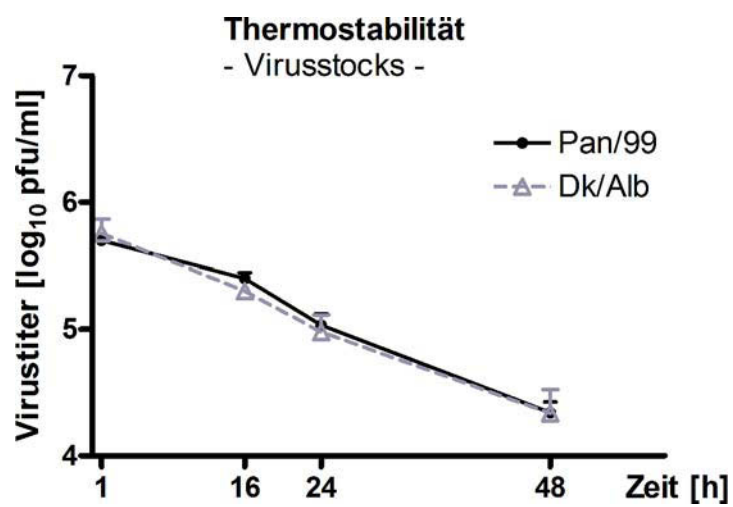
**Saisonale Influenzaviren infizieren keine Typ I Pneumozyten.** Lungenkulturen wurden für 24 h mit Pan/99 infiziert und anschließend für die immunhistologische Analyse aufgearbeitet. Schnitte wurden mit einem anti-Influenza-AK (grün) und einem anti-Caveolin 1-AK (rot) inkubiert (Ergebnisse Anne Becher, Weinheimer and Becher *et al.* (eingereicht)).

Anhang III



**Saisonale, aviäre, porcine und pandemische Influenzaviren können in Alveolar-makrophagen nachgewiesen werden.** Lungenkulturen wurden für 24 h mit den angegebenen Viren infiziert und anschließend für die immunhistologische Analyse aufgearbeitet. Schnitte wurden mit einem anti-Influenza-AK (grün) und einem anti-CD68-AK (rot) inkubiert (Ergebnisse Anne Becher, Weinheimer and Becher *et al.* (eingereicht)).

Anhang IV



**Thermostabilität Virionen aviärer und saisonaler Influenzviren bei 37°C.**  $4 \times 10^5$  pfu des aviäre und des saisonale Viren wurden bei 37°C in RPMI-Medium inkubiert und die Menge infektiöser Partikel zu den angegeben Zeitpunkten mittels Plaquetest auf MDCK-Zellen bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von zwei unabhängigen Experimenten